

**DANIEL MALINGRE VIEIRA**

**Expressão de Adrenoceptores  $\beta$  em Tecido Cardíaco de  
Ratos Intoxicados por Cádmio e Tratados com  
Concentrado de Suco de Uva**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de São  
Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

**SÃO PAULO**  
**2012**

**Daniel Malingre Vieira**

**Expressão de Adrenoceptores  $\beta$  em Tecido Cardíaco de  
Ratos Intoxicados por Cádmio e Tratados com  
Concentrado de Suco de Uva**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências pelo programa de Pós - Graduação em Farmacologia - Área de Concentração Fisiofarmacologia.

**Orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Spadari  
Universidade Federal de São Paulo

**Co-orientadora**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Isabel Cristina Céspedes  
Universidade Federal de São Paulo

**SÃO PAULO**

**2012**

VIEIRA, DANIEL MALINGRE

Expressão de Adrenoceptores  $\beta$  em Tecido Cardíaco de Ratos Intoxicados por Cádmio e Tratados com Concentrado de Suco de Uva/ Daniel Malingre Vieira, Orientação Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Célia Spadari – São Paulo: 2012.

59p

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

Título em inglês: Expression of  $\beta$ -adrenoceptors in cardiac tissue of rats intoxicated with cadmium and treated with concentrated grape juice

1. Cloreto de cádmio; 2. Receptores  $\beta$ -adrenérgicos; 3. Tecido cardíaco; 4. Concentrado suco de uva.

**Daniel Malingre Vieira**

**Expressão de Adrenoceptores  $\beta$  em Tecido Cardíaco de  
Ratos Intoxicados por Cádmio e Tratados com  
Concentrado de Suco de Uva**

**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Caden Souccar

Departamento de Farmacologia  
Universidade Federal de São Paulo

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.** Lucia Lameirão Garcez do Carmo

Departamento de Farmacologia  
Universidade Federal de São Paulo

**Prof. Dr.** Cláudio Heitor Balthazar

Departamento de Ciências Fisiológicas  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

**Suplente**

**Prof. Dr.** Gerhardus Hermanus Schoorlemmer

Departamento de Fisiologia  
Universidade Federal de São Paulo

**Apoio Financeiro**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior  
(CAPES)

Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das  
Universidades Federais  
(REUNI)

## AGRADECIMENTOS

*Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.*

*Em primeiro lugar agradeço a Profa. Dra Regina Celia Spadari por me acolher e acreditar em mim, por todo aprendizado, parceria, profissionalismo e acima de tudo, obrigado por estimular o meu interesse pelo conhecimento e pela vida acadêmica.*

*Igualmente importante, meus agradecimentos a Profa. Dra. Isabel Cristina Cespedes que sempre esteve presente para apoiar, sugerir, corrigir e acima de tudo contribuir!*

*À minha amiga e parceira essencial neste trabalho Daniela Ortolani, pelo inestimável auxílio, mesmo nas condições adversas, imensa boa vontade e prestatividade.*

*A Vanessa Cardoso Pires e ao Professor Dr. Odair Aguiar Jr cujo trabalho, apoio e colaboração serviram de pedra fundamental a execução deste trabalho.*

*A meus pais e minha irmã por oferecer condições de suporte nos muitos momentos que precisei deles.*

*A minha noiva Sabrina Monique Previati, cujo apoio, sorriso e companheirismo sempre foram eficazes em elevar meu ânimo. Obrigado por existir.*

*A todos os meus colegas e amigos do Best, cuja interação não apenas me acrescentou conhecimento, mas agregou amizade nesse período que trilhamos juntos.*

*Agradecimento especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida neste período.*

## RESUMO

O cádmio é um metal pesado encontrado em cigarros. Também contamina a alimentação humana, sendo a fonte primária de exposição e intoxicação entre os não fumantes. A intoxicação pelo cádmio é tratada com agentes quelantes, mas a utilização de antioxidantes é uma alternativa terapêutica. O cádmio afeta principalmente os rins, fígado e ossos, e pode estar relacionado com o prognóstico de mortalidade por câncer. No entanto, seus efeitos sobre o coração ainda não estão claros. O objetivo deste trabalho foi investigar a possível ocorrência de alterações na expressão dos subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  de adrenoceptores cardíacos em ratos Wistar adultos machos intoxicados com  $\text{CdCl}_2$  e verificar se a ingestão de concentrado de suco de uva pode alterar este quadro. Para isto, foram constituídos 4 grupos de animais: controle, intoxicados com dose única de  $\text{CdCl}_2$  (1,2 mg/Kg de peso, ip), tratados durante 60 dias com doses diárias (2,36 g/Kg) de concentrado de suco de uva (G8000®, contendo 4,5% de resveratrol) e intoxicados com  $\text{CdCl}_2$  e tratados com concentrado de suco de uva concomitantemente. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos com relação ao ganho de massa corporal ou na massa cardíaca final. No coração de ratos intoxicados com  $\text{CdCl}_2$ , tratados ou não com concentrado de suco de uva, houve menor expressão do adrenoceptor  $\beta_1$ , e o tratamento com o concentrado de suco de uva não promoveu sua redução. Houve aumento significativo na expressão do adrenoceptor  $\beta_2$ , que foi reduzido pelo tratamento com o concentrado de suco de uva a índices inferiores aos observados no grupo controle. O tratamento com o concentrado de suco de uva não promoveu isoladamente alteração na expressão deste receptor em relação ao grupo controle. Desta forma, pôde-se concluir que a intoxicação por cádmio causou alterações na proporção dos subtipos de adrenoreceptores  $\beta$  em tecido cardíaco uma vez que houve *down-regulation* de adrenoceptores  $\beta_1$  e *up-regulation* de adrenoceptores  $\beta_2$ . O tratamento com concentrado de suco de uva foi efetivo em atenuar o aumento da expressão do adrenoreceptor  $\beta_2$  induzido pelo cádmio mas não modificou seu efeito sobre a expressão dos adrenoceptores  $\beta_1$ .

**Palavras-chave:** cloreto de cádmio, receptores  $\beta$ -adrenérgicos, tecido cardíaco, concentrado de suco de uva

## ABSTRACT

Cadmium is a heavy metal found in cigarettes. It also contaminates the food, being the primary source of exposure and intoxication among nonsmokers. Poisoning by cadmium is treated with chelating agents, but the use of antioxidants is an alternative therapy. Cadmium mainly affects the kidneys, liver and bones, and may be related to the prognosis of mortality by cancer. However, its effects on the heart remain unclear. The objective of this study was to investigate the possible occurrence of changes in the expression of  $\beta_1$  and  $\beta_2$  subtypes of cardiac adrenoceptors in male adult Wistar rats intoxicated with CdCl<sub>2</sub> and whether the ingestion of concentrated grape juice can change this picture. Animals were assigned to one of the following groups: control; intoxicated with a single dose of CdCl<sub>2</sub> (1.2 mg/Kg, ip); treated for 60 days with daily doses (2.36 g/kg) of concentrated grape juice (G8000 ®, containing 4.5% of resveratrol); intoxicated with CdCl<sub>2</sub> and concomitantly treated with concentrated grape juice. The results showed no significant difference between groups with respect to body mass gain during the treatment period or heart mass. The expression of  $\beta_1$ -adrenoceptors was lower in the heart of rats intoxicated with CdCl<sub>2</sub>, treated or not with concentrated grape juice. The treatment with the concentrated grape juice did not significantly alter this effect. Cadmium also induced an increase in the expression of cardiac  $\beta_2$ -adrenoceptors, which was reduced in the rats treated with concentrated grape juice at rates lower than those observed in the control group. The concentrated grape juice alone did not cause changes in the expression of this receptor in the control group. It is concluded that the cadmium poisoning caused changes in the proportion of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in cardiac tissue, since there was down-regulation of  $\beta_1$ -adrenoceptors and up-regulation of  $\beta_2$ -adrenoceptors. Treatment with concentrated grape juice was effective attenuating the increased expression of the  $\beta_2$ -adrenoceptors induced by cadmium but did not modify its effect on the expression of  $\beta_1$ -adrenoceptors.

**Keywords:** cadmium chloride,  $\beta$ -adrenergic receptors, cardiac tissue, concentrated grape juice



## Lista de Abreviaturas

<b>AC</b>	Adenilil-ciclase
<b>AD</b>	Átrio direito
<b>AE</b>	Átrio esquerdo
<b>ALA</b>	Alanina
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Anti-IgG</b>	Anti-imuno gama globulina
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Cd</b>	Cádmio
<b>Cd/m<sup>3</sup></b>	Cádmio por metro cúbico
<b>DC</b>	Débito cardíaco
<b>DMPS</b>	Sulfonato dimercapto propano
<b>DMSA</b>	ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido tetra-acético etilenodiamina
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase endotelial
<b>ER</b>	Espécies reativas
<b>ERC</b>	Espécies reativas de carbono
<b>ERCI</b>	Espécies reativas derivadas do cloro
<b>ERN</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>ERS</b>	Espécies reativas derivadas do enxofre
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
<b>Gi</b>	Proteína G inibitória
<b>GPx</b>	Glutathione peroxidase.
<b>Gs</b>	Proteína G estimulatória

**GSH** Glutathiona

**HIV** Vírus da imunodeficiência humana

**I.p** Intraperitoneal

**LDL** Lipídeo de baixa densidade

**LY294002** 2-(4-Morfolinil)-8-fenil-4H-l-benzopirano-4 (antagonista de PI3K)

**M<sup>nt</sup>** metais de transição

**NAC** N-acetil cisteína

**ng/m<sup>3</sup>** Nanograma por metro cúbico

**NFκB** Fator nuclear kappa B

**NO** Óxido nítrico

**O-cGMP** Óxido nítrico guanosina 3'5' monofosfato

**pH** Potencial de hidrogenação

**PKA** Proteínas quinases dependentes de AMPc

**PTX** Toxina Pertussis

**PMSF** Fluoreto sulfonilfenilmetil

**RNA** Ácido ribonucleico

**RPM** Rotações por minuto

**SDS** Dodecilsulfato de sódio

**SOD** Superóxido dismutase

**TBS-Tween** Tampão trissalino + Tween

**UA** Unidades arbitrárias

**UVB** Ultravioleta B

**UVC** Ultravioleta C

**VD** Ventrículo direito

**VE** Ventrículo esquerdo

**VS** Volume sistólico

**µg** Micrograma

**µg/Kg** Micrograma por quilo

## Lista de Figuras

Fig. 1. Entrada e percurso do cádmio no organismo humano.....	4
Fig. 2. Fontes e respostas celulares às espécies reativas em geral.....	10
Fig. 3. Sistema de anéis dos flavonoides.....	12
Fig. 4. Comparação entre a G8000 e outros alimentos ricos em compostos fenólicos.....	13
Fig. 5. Estrutura química da molécula de <i>trans</i> -resveratrol glicosídeo.....	15
Fig. 6. Composição do Concentrado de Suco de Uva (G8000®).....	20
Fig. 7. Massa corporal (g) dos ratos ao início e ao final do tratamentos.....	23
Fig. 8. Ganho de massa corporal (g) dos animais.....	23
Fig. 9. Massa absoluta do coração (g) dos animais.....	24
Fig. 10. Massa relativa do coração (g) dos animais.....	24
Fig. 11. Massa absoluta (g) das câmaras cardíacas dos animais.....	25
Fig. 12. Massa relativa (g) das câmaras cardíacas dos animais.....	26
Fig. 13. Expressão de adrenoceptores $\beta_1$ no ventrículo esquerdo dos animais....	27
Fig. 14. Expressão de adrenoceptores $\beta_2$ no ventrículo esquerdo dos animais....	28

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Metais Pesados e Cádmio.....	1
1.2. Cádmio e o Sistema Cardiovascular.....	3
1.3. Defesa Antioxidante.....	5
1.3.1. Espécies reativas de oxigênio (EROS).....	7
1.3.2. Estresse oxidativo.....	8
1.4. Suco de Uva.....	8
1.4.1. Concentrado Suco de Uva (G8000).....	10
1.4.2. Resveratrol e o Sistema Cardiovascular.....	11
1.5. Receptores Alfa e Beta Adrenérgicos.....	12
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>15</b>
3.1. Animais.....	15
3.2. Grupos Experimentais.....	15
3.3. Concentrado de Suco de Uva.....	16
3.4. Determinação da Massa Corporal e da Massa Absoluta e Relativa do Coração e das Câmaras Cardíacas.....	17
3.5. <i>Western Blot</i> .....	18
3.6. Análise Estatística.....	19
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. Massa Corporal dos Animais.....	19
4.2. Massas Absoluta e Relativa do Coração e das Câmaras Cardíacas.....	20
4.3. Expressão dos Adrenoreceptores $\beta_1$ e $\beta_2$ no Tecido Cardíaco.....	23
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>47</b>

## **1. Introdução**

### **1.1. Metais Pesados e Cádmio**

Os metais pesados são definidos como aqueles que possuem densidade específica superior a 5 g/cm<sup>3</sup>, tais como o chumbo, o alumínio o mercúrio, o arsênio, o cádmio e o níquel. São amplamente distribuídos na crosta terrestre, mas se apresentam em concentrações muito baixas nos organismos vivos. A sua presença na atmosfera, no solo e na água, mesmo em pequenas quantidades, pode causar problemas sérios para todos os organismos. Seu maior impacto sobre a saúde humana é principalmente pela exposição ocupacional, a contaminação ambiental e o acúmulo em alimentos, particularmente em hortaliças cultivadas em solo contaminado, constituindo-se um problema de saúde pública (Goyer, 1996).

Os metais pesados são tóxicos porque podem ter efeitos cumulativos prejudiciais que podem causar alterações degenerativas crônicas (Ibrahim *et al.*, 2006). O mecanismo de toxicidade de alguns metais pesados ainda permanece desconhecido, embora a inibição enzimática, a função metabólica antioxidante prejudicada e o estresse oxidativo possam desempenhar um papel preponderante neste aspecto. Sugere-se que os metais pesados gerem muitos dos seus efeitos adversos para a saúde por meio da formação de radicais livres, resultando em danos ao DNA, peroxidação lipídica e depleção de grupos sulfidrilas (-SH) (Valko *et al.*, 2005).

A importância destes metais como perigo para a saúde ambiental é evidente pelo fato de que eles são classificados como uma das dez substâncias mais perigosas ao homem pela Agência de Substâncias Tóxicas e Lista de Doenças Prioritárias com Registro de Substâncias Perigosas (ATSDR, 2005). Esta lista é baseada na toxicidade de uma substância e o seu potencial para a exposição do homem a partir da água, do ar ou a contaminação do solo. Como os metais não são biodegradáveis, podem persistir no ambiente e produzir uma variedade de efeitos adversos por tempo indeterminado aos organismos expostos a eles.

O cádmio caracteriza-se pela persistência ambiental e meia-vida de eliminação longa (15 a 30 anos), o que explica sua acumulação nos organismos vivos (Satarug & Moore, 2004). É um metal presente na natureza em baixas concentrações, muitas vezes associado ao zinco, chumbo e cobre. Entretanto, devido às atividades humanas, como a queima de combustíveis fósseis, fabricação de baterias, produção de pigmentos e estabilizantes, fabricação de munições e utilização de alguns fertilizantes na agricultura, a exposição a este metal é significativa e pode ocorrer através do ar, alimentos e água contaminada (Muntau & Baudo, 1992; WHO, 1992; Orisakwe *et al.*, 2004). Dentre os metais, o cádmio é um elemento identificado relativamente há pouco tempo (Robards & Worsfold, 1991). Foi descrito como elemento químico distinto em 1817 (Sherlock, 1984; Robards & Worsfold, 1991). É um metal eletropositivo, apresentando o estado de oxidação +2 e, neste sentido, assemelha-se aos elementos do grupo IIB (zinco e mercúrio; Mahan, 1972) ou à família 12 da tabela periódica (Fonseca, 1993).

O cádmio penetra no organismo essencialmente por duas vias: a inalatória e a digestiva. A via inalatória ocorre essencialmente em ambiente industrial. A quantidade de cádmio absorvido por essa via depende de alguns fatores: (I) do tamanho, da forma química e da solubilidade das partículas retidas; (II) da quantidade do metal depositado e (III) do mecanismo de depuração. Também associado à via respiratória tem-se o cádmio proveniente dos cigarros. Há estudos que indicam que um indivíduo que fume 20 cigarros por dia faça uma inalação diária de 40 µg de cádmio. Cada cigarro contém 0,8 a 2 µg de cádmio sendo aproximadamente 25% a 45% absorvido por inalação quando do seu consumo (Klaassen *et al.*, 1996 e 2001; Calabuig, 2004; Cespon-Romero, 2008). Além desta via, a exposição ao cádmio ocorre especialmente através dos alimentos, em particular nas ostras, mariscos e plantas, podendo atingir valores entre os 100 e 1000 µg/kg. A carne, o peixe e os frutos podem conter entre 1 a 50 µg/kg, enquanto que as sementes entre 10 a 150 µg de cádmio/kg (Klaassen *et al.*, 1996 e 2001; Rubio *et al.*, 2006; Reeves *et al.*, 2008).

A ação tóxica do cádmio deve-se à sua afinidade por radicais dos grupos sulfidril, hidroxila, carboxila, fosfato e outros e à sua ação competitiva com outros elementos funcionais essenciais, tais como o Zn, Cu, Fe e Ca. Acredita-se que seus efeitos deletérios sobre estruturas celulares ocorram através da alta

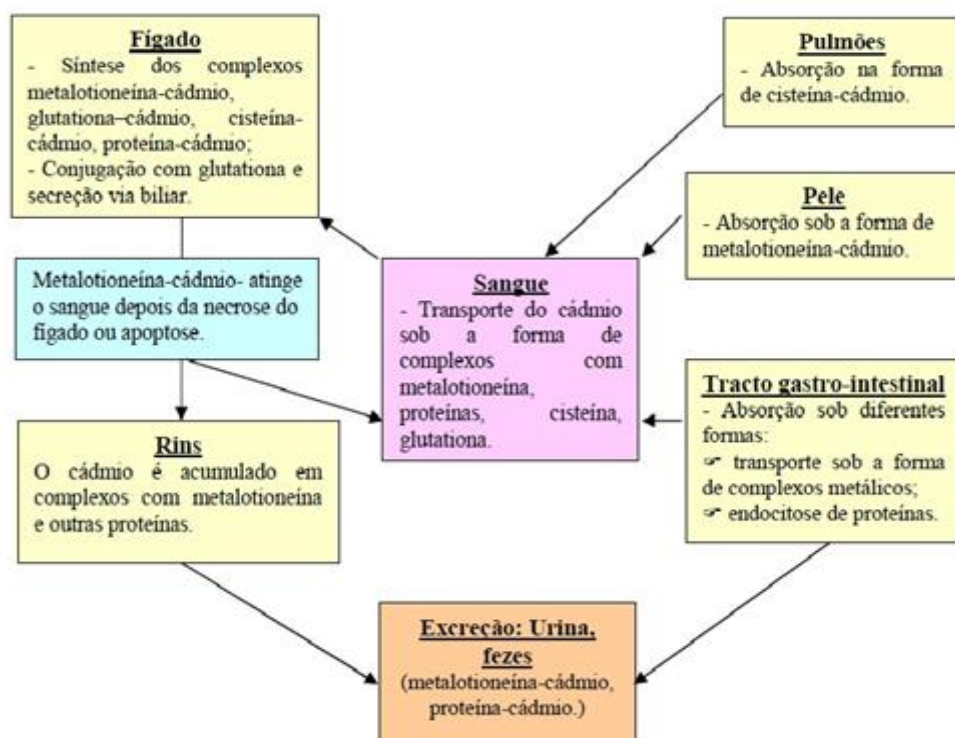
afinidade do cádmio aos grupos sulfidríla (-SH) das proteínas intracelulares, inativando inúmeras reações enzimáticas bem como de aminoácidos e antioxidantes endógenos que contenham enxofre, tais como N-acetil cisteína (NAC), alanina (ALA) e glutatona (GSH); tende também a se ligar a metalotioneína substituindo o zinco, cobre e outros metais, reduzindo a eficácia das metaloenzimas e gerar quebra das ligações sulfídricas com consequente alteração enzimática e de processos bioquímicos (Klaassen *et al.*, 1996, 2001; Calabuig, 2004). De todos os metais tóxicos encontrados no ambiente e utilizados industrialmente, o cádmio é de grande interesse clínico, uma vez que as intoxicações por cádmio são difíceis de serem tratadas (Jones e Cherian, 1990).

Foi recentemente demonstrado que o cádmio afeta também o sistema reprodutor, onde causa edema, hemorragia, atrofia e necrose dos testículos. Observaram-se também efeitos tóxicos sobre o epidídimo, a vesícula seminal e a próstata com redução no peso relativo e diversas alterações histológicas indicativas de apoptose nestes órgãos (Pires *et al.*, 2012). Em humanos, foi relatada uma correlação significativa entre aumento da concentração de cádmio no plasma sanguíneo e diminuição da qualidade do sêmen, incluindo redução no número, motilidade e morfologia espermática, bem como aumento do hormônio folículo estimulante (FSH) circulante e lesões oxidativas no DNA de espermatozoides (Xu *et al.*, 2003; Akinloye *et al.*, 2006).

Para prevenção de efeitos adversos pulmonares e renais foram traçados, pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1980), limites de exposição ocupacional ao cádmio absorvido através do cigarro e de partículas em suspensão inaláveis: 250 µg para Cd/m<sup>3</sup> para exposições curtas. Em exposições laborais contínuas, desde que o tempo médio em ambiente de trabalho (40h/semana) seja respeitado, estabeleceu-se um limite máximo de exposição de 10 µg Cd por metro cúbico de ar. Recomenda-se que medidas de controle sejam aplicadas quando as concentrações de cádmio na urina e no sangue de indivíduos expostos excedam 5 µg Cd/g de creatinina e 5 µg Cd /litro de sangue respectivamente. Foi preconizado como máximo aceitável de referência para ingestão de cádmio o valor de 0,005 mg/litro de água (WHO, 1984).

A exposição ambiental ao cádmio foi estudada pelo “Working Group Developing Air Quality Guidelines”, uma subdivisão da OMS (WHO, 1987). Este

estudo, que não considera possíveis efeitos carcinogênicos, traça as seguintes recomendações: (a) em áreas rurais não devem ser permitidas concentrações superiores a 1-5 ng/m<sup>3</sup> de Cd, (b) em áreas urbanas e industrializadas sem atividades agrícolas, o limite máximo tolerável é de 10-20 ng/m<sup>3</sup>. O Comitê de Aditivos Alimentares e Contaminantes (FAO), juntamente a OMS, estabeleceu em 400-500 µg a ingestão máxima tolerável de cádmio por semana para adultos (WHO, 1989).



**Fig. 1.** Entrada e percurso do cádmio no organismo humano (adaptado de Godt *et al.*, 2006)



## 1.2. Cádmio e o Sistema Cardiovascular

A exposição ao cádmio desencadeia prejuízos ao sistema cardiovascular, podendo gerar hipertensão (Schroeder e Vinton, 1962; Satarug *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010) e infarto do miocárdio (Everett & Frithsen, 2008). Embora os mecanismos exatos de interação do cádmio com o tecido cardíaco ainda sejam pouco elucidados, sugere-se que a elevação dos radicais livres e/ou diminuição do potencial antioxidante de enzimas intracelulares, tais como a glutatona cardíaca (Manna *et al.*, 2008), resultem na oxidação de componentes celulares, gerando insuficiência funcional.

Alterações no miocárdio de animais expostos cronicamente (via i.p, período de 16 dias, dose de 1mg/kg/peso do rato/dia) ao cádmio incluem a redução da densidade dos vasos sanguíneos e redução do volume relativo dos cardiomiócitos. Danos nas estruturas nucleares e nucleolares foram detectados, juntamente com sinais de edema difuso de miofibrilas dos cardiomiócitos e dilatação dos espaços intercelulares no miocárdio de animais expostos ao cádmio. Essas mudanças são indicativas do desenvolvimento de insuficiência miocárdica plástica regenerativa (Zaslavina *et al.*, 2007). Além das alterações citadas, outras também têm sido encontradas na análise histológica do coração de ratos intoxicados com cádmio. Segundo alguns trabalhos, alterações específicas em relação à morfologia cardíaca normal se distinguem, e entre elas ocorre o aumento da espessura da parede ventricular e do diâmetro dos óstios atrioventriculares, bem como alterações degenerativas mediadas por inflamação crônica e fibrose estão presentes no remodelamento cardíaco presente na intoxicação pelo cádmio (Yazihan *et al.*, 2011). No coração de caranguejos de água doce, significantes alterações também foram observadas tais como edema do miocárdio, degeneração vacuolar e vítrea e infiltração de células inflamatórias. Do mesmo modo, alterações nos núcleos, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso, bem como miofibrilas também foram observadas (Lei *et al.*, 2011).

A maioria das lesões nas células musculares cardíacas decorrentes da exposição ao cádmio deve-se ao aumento dos radicais livres e peroxidação lipídica, principalmente quando ocorre exposição crônica (Ozturk *et al.*, 2009). Alterações no perfil de transaminases glutamato oxalacetato e lactato

desidrogenase (dose: 0,44mg/kg, ip.) e enzimas antioxidantes cardíacas, particularmente malonaldeído, catalase, glutathione e superóxido dismutase (dose: 40 mg/l, vo) também são observadas, bem como alterações mitocondriais envolvendo distúrbios na cadeia respiratória e ciclo de Krebs gerando redução na formação de ATP (Amara *et al.*, 2009; Mitra *et al.*, 2012).

Em período de intoxicação crônica (dose v.o, 15 mg Cd<sup>+2</sup>/kg/dia, período de 60 dias) e aguda (dose única de 15 mg Cd<sup>+2</sup>/kg, parâmetros analisados após 60 dias) houve registro de aumento de volume sistólico (VS) e do débito cardíaco (DC), porém sem alteração de frequência cardíaca (FS) (Ozturk *et al.*, 2009). Em coelhos intoxicados com cádmio (20 µg/ml de cádmio adicionados a água de consumo dos animais), a redução da contratilidade cardíaca e o aumento da resistência vascular aórtica observados em longo prazo (9 meses), foram interpretados como mecanismos de adaptação para a preservação do equilíbrio hemodinâmico, pois não há modificação de outros parâmetros tais como a pressão arterial, frequência cardíaca e consumo de oxigênio (Boscolo & Carmignani, 1986).

### **1.3. Defesa Antioxidante**

Antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, se comparadas aos substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes etapas da sequência oxidativa (Halliwell & Gutteridge, 1985).

O oxigênio é um elemento indispensável à vida e que, ao mesmo tempo, pode causar danos ao organismo (Halliwell & Gutteridge, 1985). As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ter papel fisiológico benéfico, tais como aquelas liberadas pelos glóbulos brancos, que fornecem mecanismos de barreira aos microrganismos patógenos, ou as envolvidas no processo de coagulação sanguínea e cicatrização, particularmente relacionadas com o NO, uma importante molécula resultante da oxidação da L-arginina, que atua em várias atividades fisiológicas vasculares, gastrointestinais e nervosas. No entanto, podem também causar injúrias ao organismo relacionadas ao estresse oxidativo. Os agentes que atuam como antioxidantes não possuem a capacidade de diferenciar entre as moléculas que produzem tais efeitos. Por esse motivo, sua

ação em alguns casos, pode provocar danos ao invés de ser vantajosa, inclusive desencadeando atividades pró-oxidantes (Bjelakovic, 2007 e Halliwell, 2007). Sendo assim, a manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de EROs, é de extrema importância para a sobrevivência dos organismos vivos, sendo que, um distúrbio poderá ocasionar uma série de processos patológicos (Bast *et al.*, 1991).

Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que estes ataquem os alvos biológicos nas células. No entanto, quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes no organismo podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo (Souza *et al.*, 2007). As células possuem mecanismos de defesa contra as EROs visando proteger seus constituintes celulares e manter o estado redox (redução x oxidação) celular. Estes se dividem em dois tipos principais: os sistemas enzimáticos e os não-enzimáticos (Yu, 1994). O sistema de defesa enzimático consiste basicamente de pequenas moléculas, entre as quais se pode destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Estas enzimas são solúveis em meio aquoso e em meio lipídico. Elas agem em geral como varredores de radicais, substâncias oxidadas pelas EROs, e assim removem os oxidantes da solução. Entre os antioxidantes não enzimáticos pode-se citar a vitamina C, a vitamina E, os carotenóides e os flavonóides. A vitamina C elimina os radicais livres do plasma, citosol e outros compartimentos aquosos. A vitamina E, e outros antioxidantes hidrofóbicos atuam fundamentalmente nas membranas e nas bicamadas lipídicas (Halliwell & Gutteridge, 2000). Os carotenoides atuam tanto na absorção do oxigênio singlete quanto de radicais livres, para interromper as reações em cadeia onde eles estão envolvidos (McNulty *et al.*, 2007). Além da proteção celular e *in vitro* contra oxigênio singlete, os carotenóides inibem a peroxidação de lipídeos em baixas pressões de oxigênio. Já os flavonoides são potentes antioxidantes capazes de atuar como aceptores de radicais livres ou de íons metálicos (Chen *et al.*, 1990). Os compostos fenólicos constituem a maior categoria de fitoquímicos de espécies vegetais, sendo que os três grupos mais importantes para a alimentação humana são os flavonóides, ácidos fenólicos e polifenóis (Angelis, 2001).

### **1.3.1. Espécies reativas de oxigênio (EROS)**

Define-se como radical livre toda espécie que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar posicionado em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Na natureza, existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres: o oxigênio no estado fundamental ( $O_2$ ) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células e, atualmente, é identificado como o fator relaxante dependente do endotélio e um importante vasodilatador (Cheeseman e Slatter, 1996; Rover Junior *et al.*, 2001).

As espécies reativas de oxigênio são produtos normais do metabolismo celular e sua presença nas células pode ser benéfica ou não, dependendo da concentração em que estão presentes. Quando encontradas em concentrações medianas, concentração está que pode variar de acordo com o tipo celular, os EROs são importantes para a defesa contra agentes infecciosos, sistemas de sinalização celular, como a ativação da guanilato ciclase com a formação do segundo mensageiro da guanosina monofato cíclica, e indução da divisão celular (Valko *et al.*, 2007).

Algumas destas espécies reativas, como os radicais superóxido, hidroxila e hidroperoxila (derivada da peroxidação de lipídeos) são freqüentemente denominadas de radicais livres por apresentarem um elétron não pareado em sua órbita mais externa. As demais moléculas, apesar de grande reatividade com componentes celulares não são considerados radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1999).

As EROs participam de reações em inúmeros processos celulares, como o processo inflamatório, na transdução de sinais como mensageiros secundários, além da ativação de alguns mecanismos de proteção como apoptose, fagocitose e até mesmo reações de desintoxicação (Salganick., 2001). Porém, em muitos casos, a reatividade das EROs pode causar reações de oxidação indesejáveis que podem levar a lesões irreversíveis aos constituintes celulares (DNA, RNA, proteínas e lipídios). Lesões estas que, se não forem reparadas, poderão alterar a funcionalidade de células, tecidos e órgãos (Pereira *et al.*, 2003).

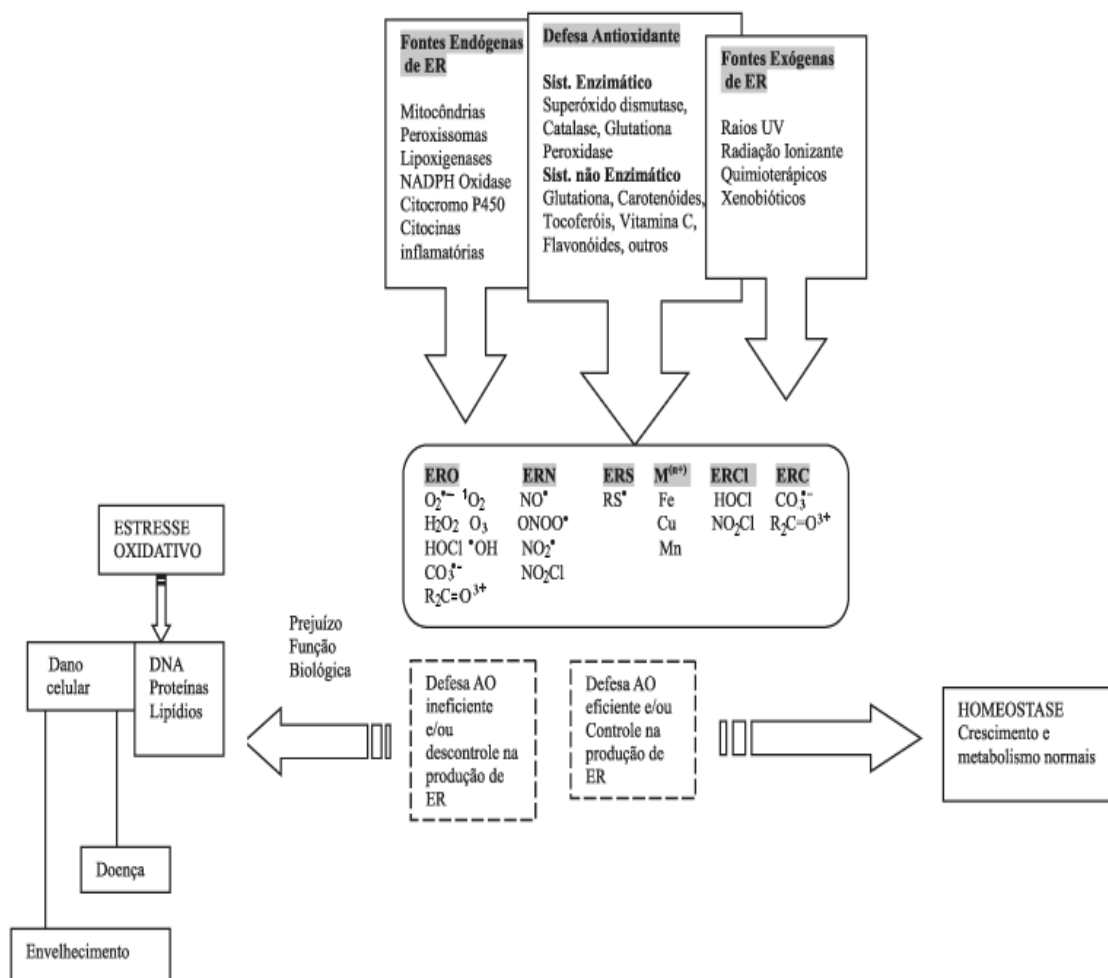
### 1.3.2. Estresse oxidativo

Ocorre estresse oxidativo quando há um desequilíbrio entre a produção de oxidantes e a concentração de defesas antioxidantes, levando a danos celulares. Este estresse pode resultar de uma situação em que há diminuição das enzimas antioxidantes, elevada produção de radicais livres, ou ambos. Os radicais livres podem ser produzidos em excesso em decorrência de algumas condições patogênicas, levando ao estresse oxidativo e à possível morte celular.

Inúmeras doenças e complicações clínicas têm sido associadas ao aumento das EROs e ao estresse oxidativo; podendo este estresse ser tanto o gerador da fisiopatologia em questão quanto surgir como consequência da doença. As doenças mais frequentemente relacionadas aos radicais livres e às EROs são as doenças cardiovasculares, artrite, hipertensão, aterosclerose, diabetes mellitus, Síndrome de Down, doenças neurodegenerativas como Mal de Parkinson e Mal de Alzheimer, envelhecimento celular, aumento da expressão e replicação do HIV e câncer (Chung *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2007).

Recentemente tem se observado o papel das EROS e do estresse oxidativo na modulação de vias de sinalização intracelular, atuando de forma altamente específica gerando um fenótipo característico dos efeitos tóxicos do oxigênio. No tecido cardíaco esses efeitos são de grande relevância não somente nas insuficiências cardíacas, mas nos eventos envolvidos no remodelamento ventricular (Seddon *et al.*, 2007).

A Figura 2 (abaixo) mostra as fontes de espécies reativas e suas interações com as respostas celulares quando as respostas antioxidantes encontram-se eficientes ou ineficientes e os efeitos orgânicos gerais resultantes.



**Fig. 2.** Fontes e respostas celulares às espécies reativas (ER) de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), derivados de enxofre (ERS), de cloro (ERCI), de carbono (ERC) e metais de transição (M<sup>n+</sup>). Oxidantes são gerados do metabolismo normal como na mitocôndria, peroxissomos e em uma variedade de enzimas citosólicas. Existem diversas fontes exógenas de produção de ER. Os sistemas de defesa antioxidante enzimático e não enzimático, quando eficientes, mantém a homeostase fisiológica e quando estão ineficientes permitem a instalação do estresse oxidativo, gerador de dano às células e em macromoléculas como o DNA, proteínas e lipídeos que se expressam clinicamente como envelhecimento ou doença.

#### 1.4. Suco de Uva

As uvas (*Vitis vinífera*) estão entre as frutas mais populares e amplamente cultivadas do mundo. Suas várias espécies possuem grande quantidade de componentes ativos e são ricas em compostos polifenólicos (Saucier *et al.*, 2001). Diversos estudos sugerem que o consumo regular da uva e dos seus

produtos exerce atividade quimiopreventiva e traz benefícios cardiovasculares e à saúde de modo geral (Pezzuto, 2008; Iriti *et al.*, 2009).

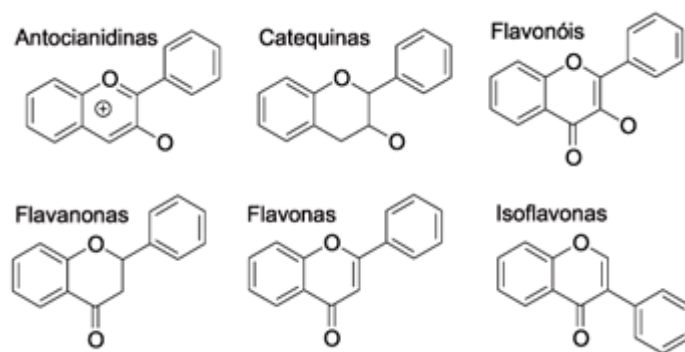
A descoberta e compreensão do fenômeno conhecido como “paradoxo francês” foi peça chave para o estímulo de pesquisas sobre os benefícios oriundos do consumo de produtos derivados da uva à saúde humana. Compreende-se que embora franceses e norte americanos mostrem os mesmos níveis de colesterol, a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares entre os franceses corresponde a um terço da encontrada entre os norte-americanos. Segundo especialistas, a causa desta aparente contradição se deve ao hábito rotineiro de consumo de vinho entre os franceses durante as refeições (Frankel *et al.*, 1993).

Atribuem-se as qualidades terapêuticas e preventivas dos derivados da uva à presença de polifenóis (Eastwood, 1999) que em razão de sua estrutura apresenta propriedade antioxidante, aparentemente devida à sua capacidade redutora ao doar prótons e, dessa forma, podendo contribuir para o estado redox e a manutenção da homeostase celular (Williams *et al.*, 2004). A biodisponibilidade de polifenóis na dieta, incluindo os derivados de uva, tem sido demonstrada anteriormente por diversos autores (Scalbert *et al.*, 2000 e Manach *et al.*, 2005). Depois da ingestão, os polifenóis são detectados no plasma, tanto na sua forma solúvel quanto associada a lipoproteínas (Fuhrman *et al.*, 1995; Hayek *et al.*, 1997). Demonstrou-se que a administração oral de flavonóides, presentes no suco de uva, confere proteção antioxidante graças à sua capacidade de reduzir a oxidação do colesterol LDL em pacientes com doença cardiovascular, além de reduzir a pressão arterial, por meio de vasodilatação dependente do relaxamento endotelial (Stein *et al.*, 1999). Estes compostos também reduzem a formação de marcadores biológicos de estresse oxidativo, tais como grupos carbonila de proteínas e removem as EROs do plasma e isoprostanos presentes na urina (O’Byrne *et al.*, 2002). Acredita-se que estes efeitos sejam determinados em particular pelas hidroxilas presentes nos sistemas de anéis dos flavonóides, que podem doar elétrons e se deslocar em torno do sistema aromático. Outro determinante estrutural importante é a capacidade antioxidante dos flavonóides atribuída às hidroxilas em C4 e C3, que atuam no aumento do potencial antioxidante (Lien *et al.*, 1999). Resultados obtidos a partir de modelos experimentais e de pesquisas *in vitro* mostraram que

a uva e seus produtos apresentam, além de efeitos antioxidantes (Dani *et al.*, 2009), também ação antiagregante plaquetária (Keevil *et al.*, 2000), melhora na função endotelial e redução na produção de LDL-oxidado, que é uma molécula diretamente associada à aterosclerose (Chou *et al.*, 2001; Decorde *et al.*, 2008). Tem também propriedades antiinflamatórias (Albers *et al.*, 2004), propriedades antitumorais (Jung *et al.*, 2006) e efeito hepatoprotetor (Dani *et al.*, 2008). Adicionalmente, os polifenóis, derivados da uva, possuem a propriedade quelante dos metais, capaz de inibir a peroxidação induzida por íons de metais através dos grupos *o*-di-hidroxila presentes em sua estrutura (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2011). Os flavonóides também promovem efeito antihipertensivo, pois induzem vasodilatação dependente do endotélio arterial, mediada pelo óxido nítrico e pela 3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclico (NO-GMPc) (Stein, 1999), assim como ativam o aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e modulam sua atividade (Wallerath, 2002). Em revisão, Maydata (2002) descreveu a relação inversa entre o consumo de vinho e a ocorrência de doenças cardiovasculares, relacionando este efeito à presença de compostos polifenólicos no vinho que atuam evitando a oxidação da fração LDL de colesterol. O suco de uva também confere proteção contra lesões oxidativas, embora sua concentração de polifenólicos seja a metade da encontrada no vinho (Maydata, 2002). Segundo Frémont (2000), o tempo de fermentação em contato com a casca da uva é fator determinante na concentração de polifenóis presentes no vinho, já que os polifenóis estão mais presentes na casca e não na polpa da uva. Sendo assim, o vinho branco possui baixa quantidade de compostos polifenólicos devido ao curto tempo de maceração.

Gollücke (2010) descreveu a melhora do metabolismo de lipoproteínas, do estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios bem como inibição da agregação plaquetária como alguns efeitos benéficos dos polifenóis e antocianinas presentes na uva. É importante ressaltar que esses polifenóis sofrem diversas reações químicas durante o processamento e armazenamento, incluindo polimerização e despolimerização, reações enzimáticas e co-pigmentação. Entretanto, tais transformações não afetam necessariamente o conteúdo final e a atividade antioxidante dos polifenóis (Gollücke, 2010).

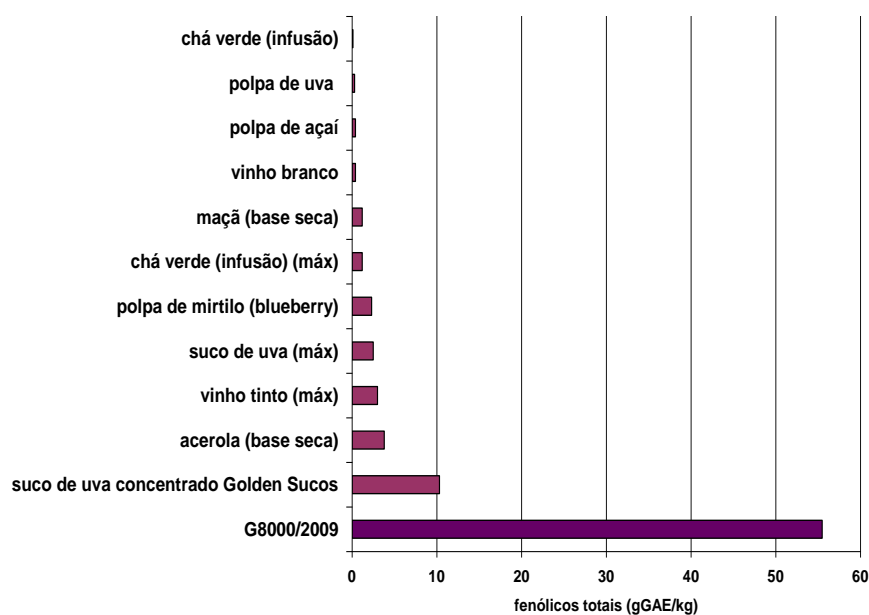




**Fig. 3.** Estrutura química dos principais tipos de flavonoides. Fonte: Molnár-Perl (2005)

#### 1.4.1. Concentrado Suco de Uva (G8000)

O concentrado de suco de uva G8000 é uma pasta púrpura de sabor ácido, levemente adstringente, utilizada na elaboração de néctares e preparo de refresco, refrigerantes, sucos, geléias e afins. Este produto contém aproximadamente 54,7 g de carboidratos (glicose e frutose); 1,3 g de proteínas; 1,0 g de lipídios; 1,4 g de fibras; 0,6 g de cinzas e 41 g de água em cada 100 g. Como diferencial, possui teor de polifenóis de 4,5%, cerca de 5,5 vezes superior ao suco de uva concentrado Golden sucos (55,5 g de ácido gálico equivalente (GAE)/kg) e teor de antocianinas 5 vezes maior que o suco de uva (11,1 g/L).



**Fig. 4.** Comparação entre o G8000 e outros alimentos ricos em compostos fenólicos

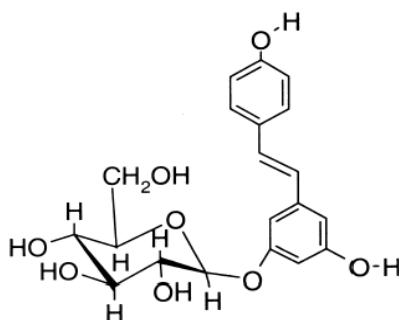
**Fonte:** Hexalab/Unisantos

#### 1.4.2. Resveratrol e o Sistema Cardiovascular

O resveratrol é um polifenol conhecido há muito tempo na terapêutica da Medicina Oriental, sendo utilizado pelos chineses e japoneses para o tratamento de arteriosclerose, doenças inflamatórias e alérgicas. Atualmente reconhece-se que o resveratrol é produzido por diversas plantas em resposta a distúrbios metabólicos, danos mecânicos, irradiação com luz ultravioleta B (UVB) e C (UVC) e ataque de fungos; na videira é onde encontra-se em sua maior concentração na natureza. O resveratrol é uma fitoalexina da classe dos estilbenos encontrada em diversas plantas e não somente na uva. Pesquisas indicam a presença de resveratrol em esponjas marinhas, amora, framboesa e até mesmo no amendoim. Mas sua presença é mais conhecida e estudada nas uvas, onde se apresenta em maior concentração na casca, podendo ser encontrado em quantidades significativas também na polpa, nos engaços e nas folhas das videiras (Stein & Hoos, 1984; Barlass *et al.*, 1987). Sua nomenclatura química é 3,5,4'-trihidroxiestilbeno. A denominação resveratrol remete à sua estrutura química, que contém um grupamento funcional resorcinol (1,3 dihidroxibenzeno), o qual não é tão facilmente oxidado quanto orto ou para-dihidroxibenzenos. Sua molécula contém dois anéis conectados por dupla ligação e apresenta dois isômeros ópticos: cis-resveratrol e trans-resveratrol, sendo este último o que apresenta atividade biológica, porém sob condições de exposição à radiação ultravioleta ou elevadas temperaturas (acima de 40°C; Prokop *et al.*, 2006) isomeriza-se à forma de cis-resveratrol.

No organismo, o resveratrol atua como antioxidante, reduzindo a formação de EROs, modulando o metabolismo de lipídeos e lipoproteínas, inibindo a agregação plaquetária; possui efeitos antiinflamatórios pela inibição da expressão de marcadores inflamatórios e antitumorais, principalmente pela inibição da expressão gênica de NFκB (redução da proliferação celular e estimulação de apoptose das células cancerígenas) (Frémont., 2000; Benitez *et al.*, 2009; Colin *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2009). Suas principais atividades biológicas são a inibição da peroxidação lipídica (LDL e membranas), ligação com radicais livres tornando-os indisponíveis aos sistemas humanos, atividade anticancerígena e atividade estrogênica (Frémont, 2000). Bertelli *et al.* (1998) avaliaram a cinética do resveratrol administrado oralmente em ratos e

verificaram que as concentrações teciduais expressam uma biodisponibilidade significativa no coração, fígado e rins, o que pode tanto explicar sua ação cardioprotetora, quanto suas ações sobre o metabolismo lipídico.



**Fig. 5.** Estrutura química da molécula de *trans*-resveratrol glicosídeo. Fonte: Waterhouse (2002)

### 1.5. Receptores Alfa e Beta Adrenérgicos

O interesse pelos mecanismos responsáveis pela resposta celular a determinados estímulos extracelulares tem sido motivo de investigação científica. Inicialmente foi proposto que agentes atuando sobre terminações nervosas, não interagiam diretamente com as células e sim com substâncias receptoras, que seriam as mediadoras da resposta celular (Limbird, 2004). Langley, em 1905, foi o primeiro autor a propor que determinados agentes, quando atuando sobre terminações nervosas, não interagiam diretamente com as células mas sim com elementos celulares receptores, que seriam os mediadores da resposta celular. Ehrlich, em 1913, usou o termo receptor para designar um grupamento químico específico que reagia a uma determinada droga. Ahlquist, em 1948, sugeriu que a estimulação adrenérgica interagia com dois tipos de receptores, os alfa ( $\alpha$ ) e os beta ( $\beta$ )-adrenérgicos. No entanto, foi Kahn, em 1976, quem melhor definiu o termo receptor, como sendo uma molécula ou complexo de moléculas, capaz de reconhecer e interagir com hormônios, drogas ou neurotransmissores e, após esta interação, gerar sinal capaz de iniciar uma cadeia de eventos, que resultaria em resposta biológica.

Neste contexto, a ação das catecolaminas é mediada por cinco subtipos de receptores de superfície celular ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ). No tecido cardíaco, as respostas cronotrópica, inotrópica e lusitrópica às catecolaminas são mediadas pelos adrenoreceptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  os quais exercem seus efeitos por meio da

ativação de um complexo proteico que inclui a proteína G estimulatória (Gs) e a adenilil ciclase (AC). Esta última, quando ativada, catalisa a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) intracelularmente, que ativa proteínas quinases dependentes de AMPc (PKA). Estas enzimas fosforilam outras proteínas, promovendo efeitos celulares específicos, de acordo com o repertório enzimático de cada célula. Em algumas circunstâncias, os adrenoreceptores  $\beta_2$  podem acoplar-se também à proteína G inibitória (Gi) que, quando ativada, inibe a via AC-AMPc-PKA e, conseqüentemente, os efeitos promovidos por esta via (Santos & Spadari-Bratfisch, 2006). No entanto, esta parece não ser a principal função do acoplamento do adrenoreceptor  $\beta_2$  com a proteína Gi, visto que este acoplamento ativa também a via Gi $\beta\gamma$ -fosfatidilinositol-3-fosfato/proteína quinase B, que exerce efeito anti-apoptótico em miócitos cardíacos demonstrado de forma inequívoca por estudos (Zhu et al., 2001) que demonstram que a inibição de Gi mediada por PTX (toxina pertussis), conduz à apoptose de miócitos, elucidou-se também que o efeito anti-apoptótico do adrenoreceptor  $\beta_2$  é mediado pela ligação a via de sinalização Gi $\beta\gamma$ -PI3K/ PKB pois também ao inibir a atividade PI3K com PTX,  $\beta$ ARK-ct, e LY294002, respectivamente, abole-se completamente a ativação de PKB estimulada pelo adrenoreceptor  $\beta_2$  e, mais importante, converte a sinalização de sobrevivência de  $\beta_2$  para apoptótica. Portanto, PI3K constitui um importante mensageiro a jusante da relação do adrenoreceptor  $\beta_2$  ligada a Gi, que protege contra a apoptose dos miócitos mediada por Gs via ativação do fator de sobrevivência PKB.

Em relação aos efeitos de sobrevivência celular mediados por PKB, vários mecanismos podem estar envolvidos. Estes incluem a fosforilação de Bad, libertando os membros da família Bcl antiapoptóticos (Datta et al., 1997), fosforilação e inativação de caspase-9 (Datta et al., 1999), e fosforilação do factor de transcrição FKHL1 (Romashkova e Makarov, 1999). Além disso, evidências recentes demonstram o efeito anti-apoptótico mediado por PKB sobre a inativação da caspase 9 que ocorre ao nível do citocromo c (Kennedy et al., 1999). Estudos recentes também demonstram que a estimulação do adrenoreceptor  $\beta_2$  protege miócitos cardíacos de estímulos apoptóticos provenientes de hipóxia ou espécies reativas de oxigênio (Chesley et al., 2000).

Em ventrículos cardíacos humanos, a população predominante de adrenoreceptores é do subtipo  $\beta_1$ , sendo de apenas 15% a 20% a proporção de adrenoreceptores  $\beta_2$  (Stiles *et al.*, 1983; Bristow *et al.*, 1986). A densidade dos adrenoreceptores  $\beta_2$  nos átrios e nós sinusal e atrioventricular é duas vezes maior do que a existente nos ventrículos (Vanhees *et al.*, 1986). Embora o grau de acoplamento dos adrenoreceptores  $\beta$  com a adenil ciclase, via proteína Gs, seja maior no subtipo  $\beta_2$  (Kaumann *et al.*, 1987; Brodde *et al.*, 1989), a afinidade da norepinefrina é maior pelo subtipo  $\beta_1$  (Bristow *et al.*, 1988), e a intensidade da resposta dos adrenoreceptores- $\beta$  à ação de agonistas é diretamente proporcional ao número de receptores (Bristow *et al.*, 1986).

Quando ocorrem estímulos prolongados, os adrenoreceptores sofrem dessensibilização, do mesmo modo que vários outros sistemas biológicos de sinalização. A dessensibilização pode se dar pelos seguintes meios: fosforilação via quinases específicas, fosforilação por quinases efetoras, endocitose do receptor, *downregulation* via fosforilação da subunidade  $\alpha$  da proteína Gs e, finalmente, por meio da redução da transcrição intracelular de RNA-mensageiro. A integridade fisiológica dos adrenoreceptores  $\beta$  é dependente de um meio ideal que pode sofrer alterações em função de diversos fatores, tais como a hiperglicemia (Gando *et al.*, 1997) e o estresse oxidativo (Di *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo promove peroxidação lipídica que, por sua vez, conduz à perda da fluidez da membrana (Cazzola *et al.*, 2004) afetando, por exemplo, a interação agonista-receptor e atacando grupos sulfidril do próprio receptor. Tais estruturas são essenciais à função receptora. Os receptores também podem ser influenciados indiretamente por fármacos e metais pesados, como o mercúrio e o cádmio, que inibem enzimas catalíticas tais como, a catecol-orto-metil-transferase (COMT) (Houston, 2007) e a monoaminoxidase (MAO) (Asagba, 2010), elevando a concentração de catecolaminas endógenas e podendo resultar em estímulo crônico sobre os

adrenoreceptores cardíacos, em particular os do subtipo  $\beta_1$  (Engelhardt *et al.*, 1999). Esta superestimulação pode gerar aumento da massa cardíaca, dos cardiomiócitos, fibrose miocárdica e disfunção progressiva. Por outro lado, de forma antagônica, em camundongos com hiperexpressão (aumento de até 200 vezes) de adrenoreceptores  $\beta_2$ , ocorre aumento da ativação basal da adenilato ciclase acompanhado de aumento na produção basal de AMPc, aumento da

contratilidade atrial e função ventricular esquerda (Milano *et al.*, 1994). Contudo, nestes animais, nenhuma alteração morfológica sugestiva de patologia cardíaca foi observada.

Neste contexto, considerando que a intoxicação por cádmio leva a inúmeras alterações cardíacas, e que os adrenoreceptores que modulam a ação do sistema nervoso simpático no coração são estruturas plásticas, cuja expressão pode ser alterada em situações de estresse fisiológico ou oxidativo, neste trabalho nos propusemos a investigar se em coração de ratos intoxicados com cádmio ocorrem alterações na expressão dos subtipos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  de adrenoreceptores. Além disso, investigamos se o tratamento com o concentrado de suco de uva, G8000, confere proteção contra estas eventuais alterações. Visto que a intervenção terapêutica tradicional na intoxicação pelo cádmio conduzida com a monoterapia de agentes quelantes como o DMSA, DMPS e EDTA a fim de remover cádmio promovem, por si, elevado número de reações adversas (Flora *et al.*, 2008), acredita-se que a utilização de antioxidantes, sozinhos ou em associação com agentes quelantes seria uma alternativa mais eficaz para o tratamento das intoxicações por cádmio como se tem observado em modelos experimentais (Pande *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004).

## **2. Objetivos**

Os objetivos do presente estudo consistiram em caracterizar as alterações da expressão de adrenoreceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  no coração após exposição aguda de ratos ao cádmio e tratamento com concentrado de suco de uva como possível atenuante das alterações causadas pelo metal.

### 3. Material e Método

#### 3.1. Animais

Foram utilizados 40 ratos *Wistar* machos, com 90 dias de vida e peso entre 330 e 405g, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo claro/escuro de 12/12 h) no Biotério do Departamento de Biociências, do *campus* Baixada Santista da Universidade Federal de São Paulo. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento (ração Nuvilab, Nuvital Ltda., Curitiba, Paraná). Os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP sob protocolo no. 0027-12.

#### 3.2. Grupos Experimentais

Os ratos (pelo menos 4 por grupo) foram distribuídos nos grupos experimentais descritos abaixo, os quais foram definidos com base no trabalho de Aguiar *et al.* (2011) :

1. **Controle (CO):** ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de 1,2 mg/kg de solução aquosa de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (0,5 ml) e gavagem diária com água em volume máximo de 1,5 ml, por 60 dias.
2. **Cádmio (Cd):** ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de 1,2 mg/Kg de peso corporal de cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) (Nuclear®, São Paulo, Brasil) (0,5 ml) e gavagem diária com água em volume máximo de 1,5 ml, por 60 dias.
3. **Concentrado de suco de uva (CSU):** ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de 1,2 mg/kg de solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9% (0,5 ml) e gavagem diária de 2,36 g/kg/dia de concentrado de suco de uva em volume máximo de 1,5 ml, por 60 dias.

4. **Cádmio + Concentrado de suco de uva (Cd + CSU):** ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de 1,2 mg/kg peso corporal de cloreto de cádmio (0,5 ml) e gavagem diária de 2,36 g/kg/dia de concentrado de suco de uva em volume máximo de 1,5 ml, por 60 dias.

Os animais expostos ao cádmio receberam uma única injeção intraperitoneal de solução de cloreto de cádmio (Nuclear®, SP, Brasil) aos 90 dias de vida (Predes *et al.*, 2010). Os demais grupos experimentais (CO e CSU) receberam uma única injeção intraperitoneal de solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9% (0,5 ml) também aos 90 dias de vida.

### 3.3. Concentrado de Suco de Uva

O concentrado de suco de uva utilizado foi o G8000 fornecido pela empresa Golden Sucos® (Farroupilha, Rio Grande do Sul, Brasil). A matéria-prima utilizada na elaboração do composto foi obtida por nanofiltração do suco de uvas vermelhas (*Vitis labrusca*), das variedades Bordô e Concord, seguida de concentração por evaporação a 68°C, propiciando maior concentração de compostos polifenólicos em relação ao suco de uva. A dose de G8000 testada no presente estudo foi estabelecida de acordo com Aguiar *et al.* (2011). O mesmo lote de G8000 foi utilizado durante todo o estudo.

A determinação do conteúdo fenólico total e a análise da atividade antioxidante do concentrado de suco de uva *in vitro* foram realizadas por Aguiar *et al.* (2011). Além disso, os mesmos autores caracterizaram os compostos presentes no produto por espectrometria de massa, conforme figura 5.



Compostos	Abundância relativa (%)
Resveratrol	30
Ácido palmítico	17
Ácido linoléico	18
Quercetina	10
Ácido cafeoil tartárico	28
Dimetoxi-flavilium	50
Ácido tartárico	47
Cafeoil glucose	35
Ácido cafeoilquínico	15
[Dissacarídeo + H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	65
Kaempferol-galactosídeo	11
Peonidina-glucosídeo	8
Quercetina-3-O-glucoronídeo	26
Malvidina-glucosídeo	24
Petunidina-3-O-acetilglucosídeo	16
Peonidina 3- <i>p</i> -cumaroilglucosídeo	11
Malvidina 3-O- <i>p</i> -cumaroilglucosídeo	11

Fonte: Aguiar et al.(2011)

**Fig. 6.** Composição do Concentrado de Suco de Uva (G8000®).

### **3.4. Determinação da Massa Corporal e da Massa Absoluta e Relativa do Coração e das Câmaras Cardíacas**

O ganho de massa corporal dos animais foi determinado através da diferença entre o peso obtido no final e no início do experimento. As pesagens foram realizadas no período da tarde em balança digital e o peso considerado foi o obtido no momento em que o animal tivesse estabilizado as quatro patas na superfície.

Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados por decapitação e, em seguida, o coração foi extraído. Este foi lavado em solução fisiológica para retirada de sangue e o excesso de líquido foi removido com

papel de filtro. Em seguida foi pesado em balança analítica de precisão. As câmaras cardíacas foram isoladas, sendo que no isolamento entre o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE), o septo interventricular foi considerado parte do VE (Andrade *et al.*, 2007). Todas as câmaras foram pesadas em balança analítica de precisão.

O cálculo da massa relativa do coração e das câmaras cardíacas de cada rato foi realizado dividindo-se a massa do órgão em gramas pela massa corporal de cada animal no dia da coleta e multiplicando-se o resultado por 100. O resultado foi expresso em gramas/100 gramas de massa corporal (g/100g).

### **3.5. Western Blot**

Para análise da expressão protéica dos adrenocetores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foi empregado o método de *Western Blot*. Para isso, foi utilizado o ventrículo esquerdo dos ratos, que após sua remoção foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . No dia da extração proteica, o tecido foi homogeneizado com solução tampão cuja composição incluiu trisma base 100 mM, 200 mM de ácido tetra-acético etilenodiamina (EDTA), coquetel inibidor de protease (Bio-Rad, CA, EUA), 10 mM de ortovanadato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 100 mM de pirofosfato de sódio e fluoreto sulfonilfenilmetil (PMSF). Posteriormente foi adicionado Triton a 10% e o homogeneizado mantido por 30 min em gelo. Após isso, o material biológico foi centrifugado a 11000 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado para determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad, CA, EUA). Quantidades fixas de proteína (100  $\mu\text{g}$ /faixa) do ventrículo esquerdo foram dissolvidas em minigel de poliacrilamida-SDS (Mini-Protean III, Bio-Rad) e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences, PA, EUA), a 15 V por 90 min. As membranas foram pré-incubadas *overnight* com tampão bloqueador contendo leite desnatado a 3%, TBS-Tween (TBS; 0,1% Tween 20) e com os anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) para as proteínas alvo. Os anticorpos foram diluídos na proporção de 1:500, em tampão bloqueador. Os *blots* foram subsequentemente expostos à *horseadish* peroxidase conjugada a anticorpos secundários anti-IgG 1:5000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA)

em 5 ml de tampão bloqueador por 1 hora a 4°C e posteriormente lavados por 30 min como descrito por Santos *et al.* (2006). Os controles apropriados (GAPDH) foram processados simultaneamente e a imunorreatividade foi visualizada em filme autorradiográfico IBF-Medix® (Rio de Janeiro, Brasil) por 30-60 seg. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica das autorradiografias reveladas, utilizando-se o programa Scion Image® (Frederick, MD, EUA).

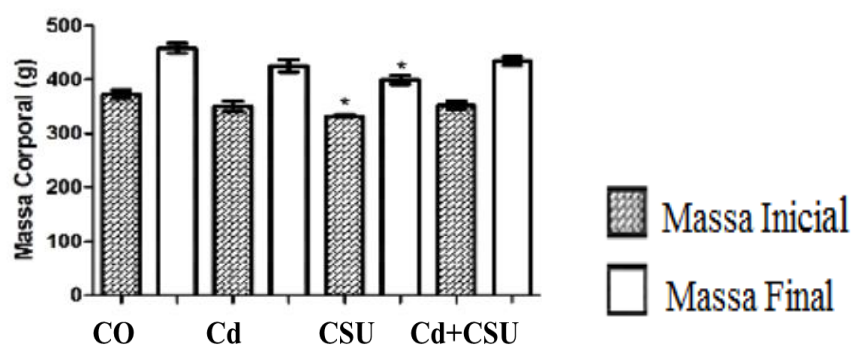
### **3.6. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram expressos como médias aritméticas, com seus respectivos erros-padrão. Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguida de teste de Bonferroni foi utilizada para comparar as médias dos grupos. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de  $p$  foi menor ou igual a 0,05. Todas as análises e gráficos foram feitos com o auxílio dos Programas Graphpad InStat e Prisma (San Diego, CA, USA).

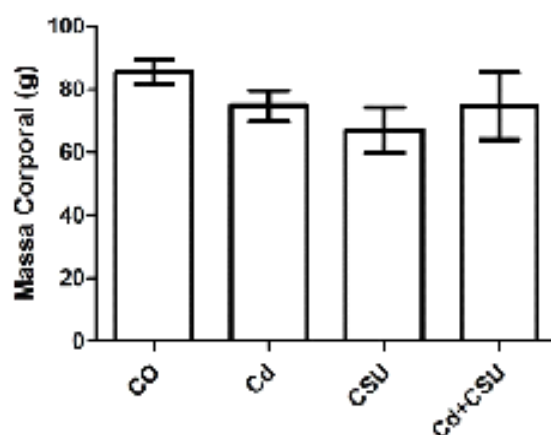
## **4. Resultados**

### **4.1. Massa Corporal**

A fim de avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a massa corporal, os animais foram pesados antes e após o período de tratamento. No início do experimento os animais dos grupos controle (CO) e tratado com concentrado de suco de uva (CSU) apresentaram diferença significativa entre si com relação à massa corporal, e esta diferença se manteve ao final do experimento (figura 7). Desta forma, observou-se que os animais demonstraram evolução semelhante de massa corporal durante os tratamentos (figura 8).



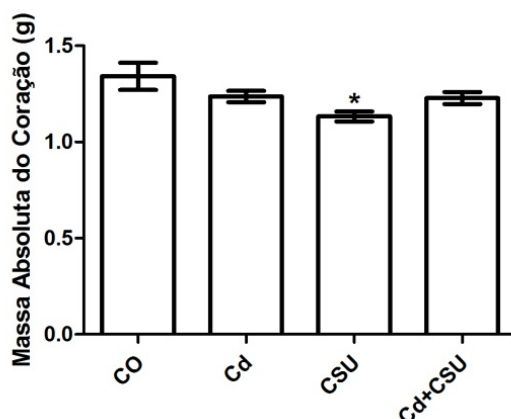
**Fig. 7.** Massa corporal (g) dos ratos ao início e ao final do tratamento dos grupos controle (CO), intoxicados com cádmio (Cd), tratados com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicados com cádmio e tratados com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). Diferença significativa (\*) na massa corporal inicial entre os animais do grupo CO e CSU, que se manteve ao final do tratamento (n=10: grupos CO, Cd e Cd+CSU; n=7: grupo CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).



**Fig. 8.** Ganho de massa corporal (g) dos animais dos grupos controle (CO), intoxicados com cádmio (Cd), tratados com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicados com cádmio e tratados com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos. (n=10: grupos CO, Cd e Cd+CSU; n=7: grupo CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

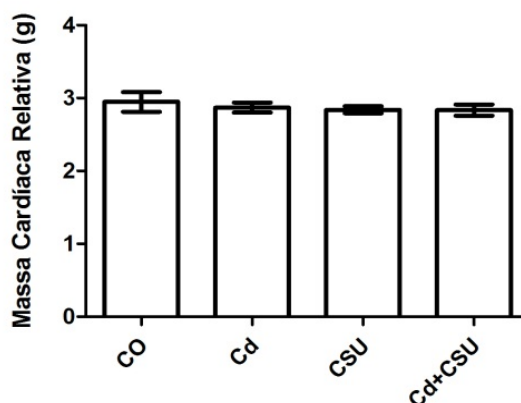
## 4.2. Massas Absoluta e Relativa do Coração e das Câmaras Cardíacas

A massa absoluta do coração dos animais intoxicados com cádmio (Cd), associado ou não ao tratamento com suco de uva (Cd+CSU), não diferiu do controle (CO). Porém, verificou-se que os animais tratados apenas com concentrado de suco de uva (CSU) apresentaram menor massa absoluta do coração comparado aos demais grupos (figura 9).



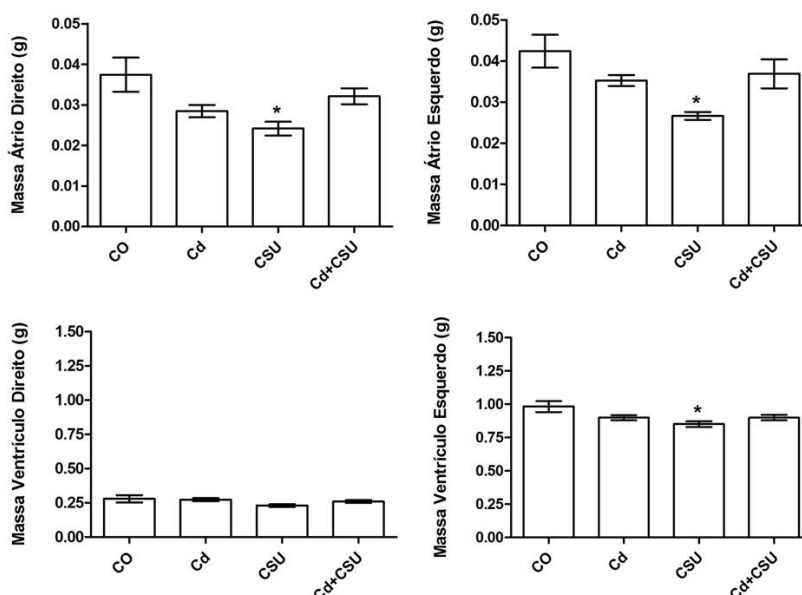
**Fig. 9.** Massa absoluta do coração (g) dos animais dos grupos controle (CO), intoxicados com cádmio (Cd), tratados com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicados com cádmio e tratados com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). Diferença significativa (\*) foi encontrada entre o grupo CSU e os demais grupos (n=7: grupos CO e CSU; n=9: grupo Cd+CSU; n=8: grupo Cd;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

Não houve diferenças estatísticas significativas entre as massas cardíacas relativas (massa do órgão/massa corporal x 100) entre os grupos analisados (figura 10).



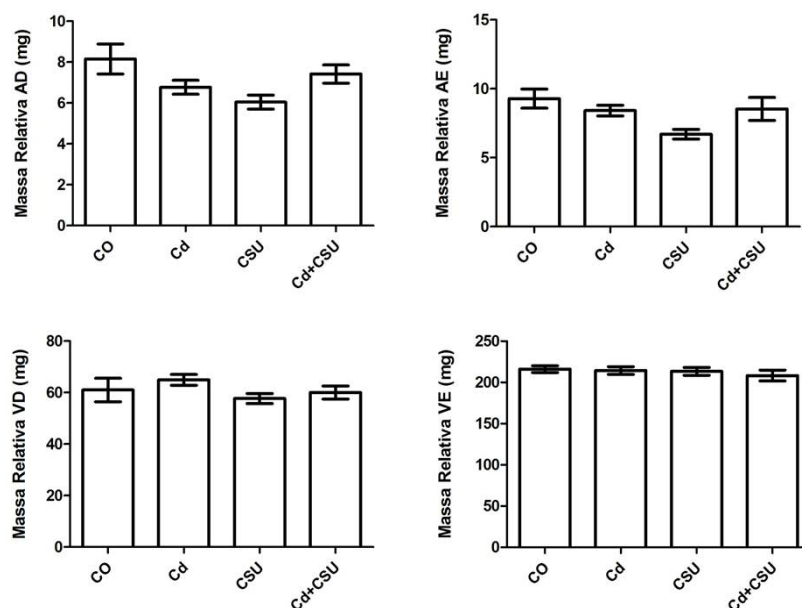
**Fig. 10.** Massa relativa do coração (g; massa do órgão/massa corporal x 100) dos ratos dos grupos controle (CO), intoxicados com cádmio (Cd), tratado com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicados com cádmio e tratados com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). (n=7: grupos CO e CSU; n=9: grupo Cd+CSU; n=8: grupo Cd;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

A massa das câmaras cardíacas de átrio direito (AD), átrio esquerdo (AE) e ventrículo esquerdo (VE) dos animais do grupo CSU foi menor em comparação ao grupo CO ao final dos tratamentos. A massa do ventrículo direito (VD) não apresentou diferenças significativas na comparação entre os grupos (figura 11).



**Fig. 11.** Massa absoluta (g) das câmaras cardíacas (AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito e VE: ventrículo esquerdo) dos ratos do grupo controle (CO), do grupo intoxicado por cádmio (Cd), do grupo tratado com concentrado de suco de uva (CSU) e do grupo intoxicado por cádmio e tratado com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). Diferença significativa (\*) foi observada entre os animais do grupo CSU e os animais do grupo CO na massa do AD, AE e VE (n=7: grupo CO; n=8: grupo Cd; n=6: grupo CSU; n=9: grupo Cd+CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

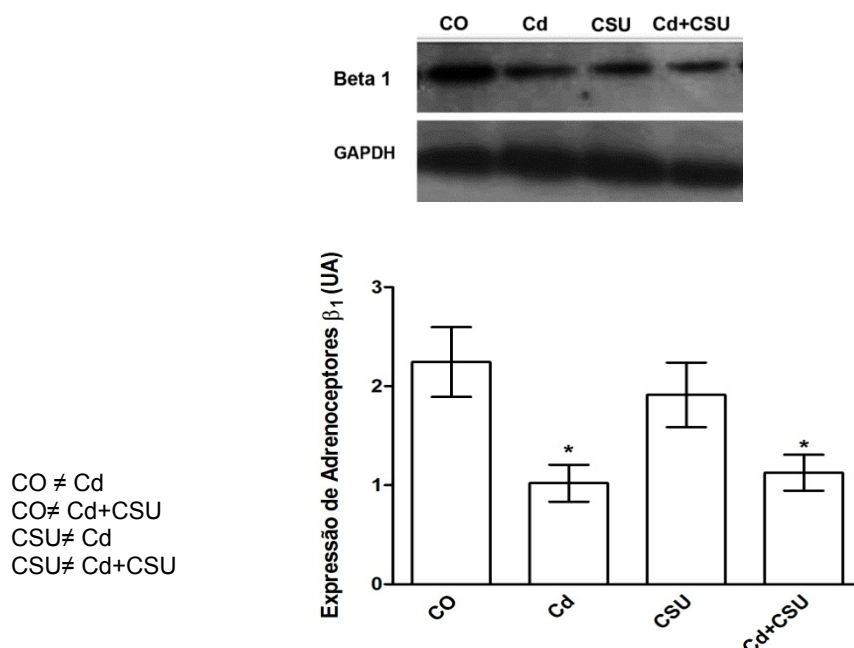
A massa relativa das câmaras cardíacas (peso da câmara/peso corporal x 100) não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais analisados (figura 12).



**Fig. 12.** Massa relativa (g) das câmaras cardíacas (AD: átrio direito, AE: átrio esquerdo, VD: ventrículo direito e VE: ventrículo esquerdo) dos ratos do grupo controle (CO), do grupo intoxicado por cádmio (Cd), do grupo tratado com concentrado de suco de uva (CSU) e do grupo intoxicado por cádmio e tratado com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (n=7: grupo CO; n=8: grupo Cd; n=6: grupo CSU; n=9: grupo Cd+CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

#### 4.3. Expressão dos Adrenoreceptores $\beta_1$ e $\beta_2$ no Tecido Cardíaco

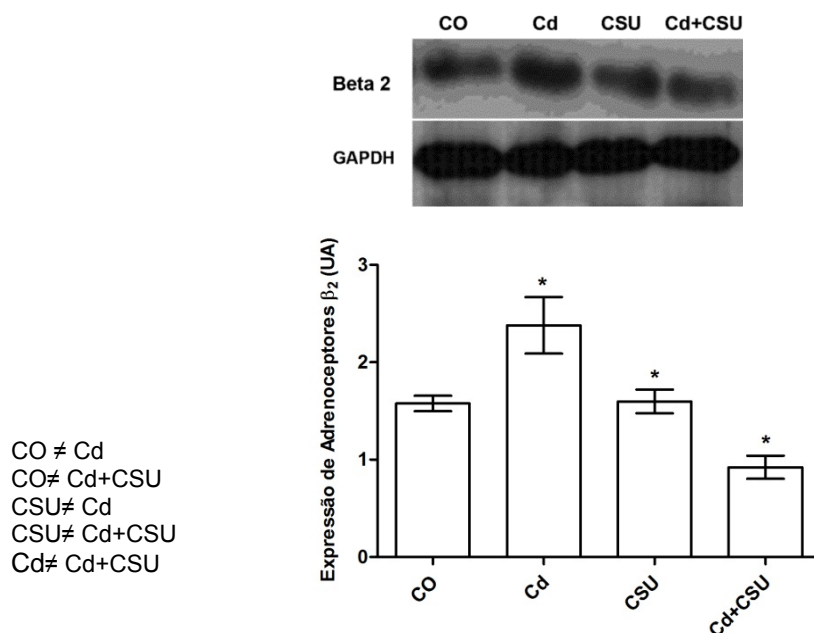
As figuras 13 e 14 mostram a expressão dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  no tecido cardíaco (ventrículos esquerdos) dos ratos analisados. Os valores de intensidade relativa, expressos em unidades arbitrárias (UA), são a razão da densidade óptica das bandas destes receptores pelos valores de densidade óptica das bandas da proteína normalizadora GAPDH. Pode-se observar que no tecido cardíaco de ratos intoxicados com cádmio, tratados ou não com concentrado de suco de uva, houve menor expressão do receptor  $\beta_1$ , e a presença do concentrado de suco de uva não promoveu alteração significativa nesta redução (figura 13).



**Fig. 13.** Expressão de adrenoreceptores  $\beta_1$  no ventrículo esquerdo (UA) em tecido cardíaco de ratos do grupo controle (CO), intoxicados com cádmio (Cd), tratado com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicados com cádmio e tratado com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). O GAPDH foi utilizado como controle interno da expressão dos receptores. Diferença significativa (\*) foi observada entre o grupo CO e os grupos Cd e Cd+CSU (n=5: grupo CO; n=4: grupo Cd; n=4: grupo CSU; n=6: grupo Cd+CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

Em tecido cardíaco de ratos intoxicados com cádmio houve aumento significativo na expressão do adrenoreceptor  $\beta_2$ , que foi reduzido pelo concentrado de suco de uva a índices inferiores aos observados no grupo controle. O concentrado de suco de uva não promoveu isoladamente alteração na expressão deste receptor em relação ao grupo controle (Figura 13).





**Fig. 14.** Expressão de adrenoceptores  $\beta_2$  no ventrículo esquerdo (UA) em tecido cardíaco de ratos do grupo controle (CO), intoxicado com cádmio (Cd), tratado com concentrado de suco de uva (CSU) e intoxicado com cádmio e com concentrado de suco de uva (Cd+CSU). O GAPDH foi utilizado como controle interno da expressão do receptor. Diferença significativa (\*) foi observada entre o grupo CO e os grupos Cd e Cd+CSU; entre o grupo Cd e os grupos CSU e Cd+CSU; e entre o grupo CSU e o grupo Cd+CSU ( $n=5$ : grupo CO;  $n=4$ : grupo Cd;  $n=4$ : grupo CSU;  $n=6$ : grupo Cd+CSU;  $p \leq 0,05$ , ANOVA e pós-teste de Bonferroni).

## 5. Discussão

O presente trabalho demonstrou que a intoxicação por cádmio não promoveu alterações no ganho de massa corporal e na massa cardíaca, mas causou redução da expressão dos adrenoceptores  $\beta_1$  e aumento da expressão de adrenoceptores  $\beta_2$  no ventrículo esquerdo de ratos. O tratamento com o concentrado de suco de uva não modificou a redução na expressão de adrenoceptores  $\beta_1$  promovida pela intoxicação por cádmio porém, atenuou o aumento da expressão de adrenoceptores  $\beta_2$  induzido pelo cádmio.

São escassos os relatos sobre o efeito do cádmio no coração apesar de seu grande interesse clínico, uma vez que as intoxicações por este metal são difíceis de serem tratadas (Jones e Cherian, 1990). Este fato nos levou a investigar os efeitos da intoxicação por cádmio no coração e adicionalmente a possível contribuição do uso de um composto com propriedades antioxidantes,

o concentrado G8000 de suco de uva, para amenizar os efeitos da intoxicação por cádmio sobre o coração.

Embora seja bem conhecido que o cádmio cause efeitos adversos sobre o sistema cardiovascular, poucos estudos têm quantificado alterações causadas por baixas doses em exposição aguda, ainda que estas promovam alterações crônicas devido a seu caráter acumulativo, dado a ineficiência dos mecanismos biológicos em promover sua depuração ou excreção (Alissa *et al.*, 2011). Foi observado que a exposição de ratos a doses baixas de Cd, por via intraperitoneal (doses de: 25, 125, 500, ou 1250 µg Cd/kg, via i.p., em dose única) apresentam peroxidação lipídica, decorrente do estresse oxidativo, resultante da redução da capacidade antioxidante endógena, em vários órgãos alvo, entre os quais o coração (Manca *et al.*, 1991). Em outro estudo (Cucelo *et al.*, 1998) dose única subletal de cádmio (1 mg Cd/kg via i.p.) acarretou, ao fim de um período de sete dias, alterações cardiovasculares. Desta forma, se justifica a opção de uso de dose única de cádmio, em baixa concentração.

Nem o cádmio nem o concentrado de suco de uva causou alteração significativa de ganho de peso entre os animais dos respectivos grupos experimentais. O suco de uva, tal como os sucos de outras frutas, é uma bebida de elevado teor calórico devido a sua composição com elevados teores de frutose e glicose. Estudos apontam o envolvimento da glicose diretamente no ganho de peso devido a sua rápida absorção e por promover elevada liberação de insulina (Pontiroli *et al.*, 2011). Entretanto, a relação da frutose com o ganho de peso não é tão clara, porém alguns estudos envolvendo o consumo de bebidas ricas em frutose demonstraram aumento do ganho de peso em humanos (Tordoff *et al.*, 1990; Schulze *et al.*, 2004), enquanto outros relataram redução da ingestão alimentar (Spitzer *et al.*, 1987; Rodin 1990; 1991) ou aumento da saciedade (Rolls *et al.*, 2000; Almiron-Roig *et al.*, 2003). Todavia têm-se observado que o consumo de suco de uva não tem sido associado ao aumento do ganho de peso em ratos em níveis de 10 mL/kg peso (Ludke *et al.*, 2010) ou humanos em níveis de 480 mL/diariamente (Hollis *et al.*, 2009). Em nosso estudo, não foi avaliada a quantidade de alimento ingerido pelos ratos, o que representa uma limitação à interpretação dos dados de ganho de peso. Possível explicação para os resultados aqui apresentados sobre a ausência de alteração de ganho de peso nos animais tratados com concentrado de suco de uva

encontra-se em seus princípios ativos polifenólicos tais como o resveratrol (Rayalam *et al.*, 2008; Mader *et al.*, 2010; Baile *et al.*, 2011; Soyoung *et al.*, 2011), quercetina (Jung *et al.*, 2012), canferol (Chang *et al.*, 2011), derivados do ácido caféico (Camargo *et al.*, 2010), peonidina e malvidina (Tsuda *et al.*, 2003). Estes compostos presentes na uva e em outras espécies de plantas, atuam sinérgicamente entre si (Baile *et al.*, 2011; Rayalam *et al.*, 2011) e exercem múltiplos e variados efeitos sobre o ciclo de vida dos adipócitos, incluindo a inibição da proliferação celular durante o desenvolvimento inicial do adipócito, inibição da diferenciação e acúmulo de lipídeos durante o desenvolvimento posterior do adipócito, promoção da lipólise e apoptose de adipócitos maduros, além de reduzir citocinas pró inflamatórias, atuar no aumento do metabolismo lipídico modulando síntese de esteróis hepáticos e atuar em mecanismos de transcrição regulatórios da lipogênese. No presente estudo, os ratos receberam cerca de 2,36g de polifenóis durante o período de tratamento (Aguiar *et al.*, 2011). Deste modo pode se inferir que a manutenção do ganho de peso dos animais tratados com G8000 em nível similar ao dos animais controles pode ser resultante das distintas atividades metabólicas mediadas pela elevada carga calórica (251,06 Kcal/100g) inerente ao concentrado suco de uva e a grande concentração de polifenóis que este composto contém. Entretanto, deve-se destacar que a ausência de alterações na comparação entre estes grupos de animais pode residir na dosagem relativamente pequena de G8000 administrados aos animais ao longo do experimento.

Os ratos intoxicados por cádmio, tratados ou não com o concentrado G8000, também não apresentaram diferença significativa de peso em relação ao grupo controle, o que está de acordo com estudos anteriores (Kolakowski *et al.*, 1983; Geyukoku *et al.*, 2005; Pires, 2012).

Espécies reativas de oxigênio, geradas por metais como o cádmio, diretamente por interferir no redox mitocondrial ou por ação indireta por mediar redução dos níveis de glutathione, ou interferir com o metabolismo do ferro, podem inibir a função metabólica mitocondrial, e reduzir a produção de energia sob a forma de ATP, por fosforilação oxidativa. Concentrações mais baixas de ATP associadas à diminuição da eficácia do ciclo do ácido tricarboxílico, por inibição de enzimas sensíveis ao estresse oxidativo, podem gerar no fígado um

desvio metabólico para a lipogênese (Kolakowski *et al.*, 1983). Esta cadeia de eventos poderia antagonizar o efeito lipolítico dos polifenóis observados na literatura. Porém, segundo Padilla *et al.* (2010), esta hipótese não está clara, em estudos de longa duração (2 anos), envolvendo amostras de sangue analisadas em espectômetro de massa e cromatografia de alta resolução, observou-se que, embora metais como bário e tálio estejam positivamente associados com a obesidade, outros metais, tais como o chumbo, cério e propriamente o cádmio associam-se à perda de peso. A análise da composição corporal destes animais intoxicados por cádmio, tratados ou não com suco de uva, poderia fornecer subsídios para esclarecer o resultado obtido.

A massa cardíaca relativa não mostrou diferenças estatisticamente significantes na comparação entre os grupos e os estudos a respeito desta variável são controversos. Alguns mostram ganho de massa cardíaca em animais intoxicados por cádmio (Christensen *et al.*, 1987; Bokori *et al.*, 1996) e outros assinalam perda de massa cardíaca (Zikić *et al.*, 1998). Resultados similares aos obtidos neste trabalho foram observados em carneiros e ratas intoxicados com cádmio (Doyle *et al.*, 1974; Hall *et al.*, 1979). Da mesma forma, como observado em outro estudo (Ludke *et al.*, 2010) não houve diferença entre os grupos controle e o tratado com o concentrado suco de uva em relação ao peso do coração e das câmaras em separado.

Houve diminuição da expressão do adrenoceptor  $\beta_1$  e aumento da expressão do adrenoceptor  $\beta_2$  no tecido muscular cardíaco dos ratos expostos ao cádmio em comparação com os demais grupos. O mecanismo exato pelo qual se observa este fenômeno ainda não está claro, porém uma possível explicação relaciona-se ao aumento na biodisponibilidade de glicocorticóides, promovida pela exposição ao cádmio (Ronco *et al.*, 2009). Estes hormônios exercem efeito facilitador sobre a ação das catecolaminas no sistema cardiovascular por meio de vários mecanismos. Em geral, observa-se que os glicocorticóides diminuem ou não alteram a expressão do adrenoceptor  $\beta_1$  e aumentam a expressão do adrenoceptor  $\beta_2$  (Spadari-Bratfisch & Santos, 2006). Ademais, os glicocorticóides promovem, indiretamente, aumento da ação de catecolaminas endógenas sobre os receptores adrenérgicos cardíacos, bem como, o cádmio também age diretamente na inativação de enzimas simpato-líticas, como a COMT (Houston, 2007) e a MAO (Asagba, 2010). Estes efeitos combinados resultam em aumento

da biodisponibilidade de catecolaminas e aumento da exposição dos adrenoreceptores cardíacos a estas, resultando em hiperestimulação adrenérgica que pode gerar dessensibilização dos adrenoreceptores  $\beta_1$  cardíacos (presentes neste tecido em maior proporção) e posteriormente *downregulation* deste receptor. Estes fenômenos alicerçam estudos anteriores em que se observou, diminuição de inotropismo e contratilidade cardíacas em animais expostos por longo tempo (9 meses) ao cádmio (Boscolo e Carmignani, 1986) e elevação do pico pressão de sistólica e redução da pressão diastólica final na intoxicação aguda induzida pela injeção intravenosa (iv) de cloreto de cádmio (dose: 7,5mg/kg). (Chen *et al.*, 1999) que demonstram a dualidade de efeitos promovidos pelo cádmio em relação a seu efeito agudo e crônico sob o coração, possivelmente resultados da distinta atividade adrenérgica gerada pelo cádmio estimulando o coração na contaminação de fase aguda em contraposição a observada disfunção cardíaca que caracteriza o coração contaminado pelo cádmio após exposição crônica.

O aumento da expressão de adrenoreceptores  $\beta_2$  tem sido detectado como mecanismo antiapoptótico adaptativo relacionado à ativação de uma via, conhecida como via não clássica de sobrevivência celular, relacionada ao desacoplamento do adrenoreceptor  $\beta_2$  da proteína Gs e acoplamento deste a Gi em via sequencialmente envolvida com PI3K e PKB, que se expressa em diversas situações patogênicas cardíacas, hipoteticamente visando proteger contra a apoptose de miócitos e retardar a progressão da cardiomiopatia e disfunção contrátil (Zhu *et al.*, 2005). Estes eventos patogênicos também estão relacionados ao estresse oxidativo e *down-regulation* de adrenoreceptores  $\beta_1$ , como ocorre na insuficiência cardíaca congestiva (Bristow, 1993). Não obstante o cádmio também induz estresse oxidativo no tecido cardíaco (Ferramola *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2011; Mitra *et al.*, 2012). Não está claro, no entanto, se a alteração na expressão de adrenoreceptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  tem efeito adaptativo benéfico ou deletério sobre o coração. Em tecido cardíaco de ratos submetidos a estresse por choque nas patas, esta alteração está associada a maiores índices de apoptose (Moura *et al.*, 2012), o que também foi detectado em coração de ratos intoxicados por cádmio (Yazihan *et al.*, 2010).

Em coelhos com cardiomiopatia induzida, o tratamento com antioxidantes foi capaz de retardar a progressão da insuficiência cardíaca bem como

restabelecer a expressão de adrenoreceptores  $\beta_1$  (Shite *et al.*, 2001). Observa-se, entretanto, que não houve diferença significativa entre o grupo Cd e o grupo Cd+CSU na expressão destes receptores, o que demonstra que os compostos presentes no concentrado de suco de uva não obtiveram êxito em normalizar os adrenoreceptores  $\beta_1$  alterados pela intoxicação por cádmio em tecido cardíaco. Pode-se especular que a dose e o período de tratamento foram insuficientes para regressão das alterações observadas. Corações de ratos induzidos ao enfarte e expostos a condições de estresse oxidativo e apresentando menor expressão do adrenoreceptor  $\beta_1$  foram tratados com doses de resveratrol administradas de forma purificada e, portanto muito mais concentrada em relação às encontradas no G8000, sendo eficazes em elevar a densidade do adrenoreceptor  $\beta_1$  (Burstein *et al.*, 2007). Outros estudos (Moran *et al.*, 1997; Halliwell, 2007 e 2008; Muqbil *et al.*, 2012) relacionam os polifenóis a um efeito pró-oxidante, lesivo ao DNA e formador de espécies reativas de oxigênio, principalmente na presença de metais de transição, como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , ligados a complexos orgânicos em condições aeróbicas, resultando nesta alteração de sua atividade, relacionada à clivagem do DNA ativada por EROs, em particular o radical hidroxila (Ahsan *et al.*, 1991; Jain *et al.*, 1999). Tais fatores poderiam justificar a incapacidade dos polifenóis em reverter às alterações geradas pela intoxicação com cádmio no presente estudo. Entretanto, é importante salientar que um número muito maior de estudos argumenta contrariamente a este resultado, onde os polifenóis revertem as alterações promovidas pelo cádmio e outros agentes geradores de radicais livres quanto a seus efeitos sobre enzimas antioxidantes, redução de apoptose e inibição da peroxidação lipídica, além de atividade antitumoral (Klempner & Bubley, 2012; Lin *et al.*, 2012).

Ainda em relação aos animais Cd+CSU, observamos que a expressão do adrenoreceptor  $\beta_2$  foi significativamente menor comparada ao grupo Cd, acreditamos que isto possa se dever a capacidade dos polifenóis (resveratrol) em reduzir a estereiodogênese através da inibição da P450 c21-hidroxilase de glândulas adrenais (Supornsilchai *et al.*, 2005), resultando em menor produção de corticosterona e, portanto, menor estímulo para produção do RNA mensageiro para o adrenoreceptor  $\beta_2$  resultando na menor produção deste adrenoreceptor no tecido cardíaco. Outra possibilidade relaciona-se a redução do

estresse oxidativo mediado pelos polifenóis do concentrado suco de uva capazes de atenuar os efeitos pró-oxidantes do cádmio, deste modo acarreta-se redução dos eventos apoptóticos teciduais cardíacos e menor *up-regulation* do adrenoceptor  $\beta_2$  relacionados a ativação da via não clássica de sobrevivência celular (Zhu *et al.*, 2005).

Adicionalmente deve-se ressaltar o fato do cádmio ser experimentalmente utilizado há anos como droga de estudo devido a sua propriedade bloqueadora dos canais de cálcio do tipo L e interferir na atividade, sob certas concentrações, no trocador  $\text{Na}/\text{H}^+$ , entretanto devido ao caráter crônico das alterações mediadas pelo cádmio observadas neste estudo, apesar da exposição inicial aguda, estudos demonstraram que esta ação do cádmio é reversível e depende de exposição contínua para promoção deste efeito (Shafer, 1998). Da mesma forma, estudo em corações de sapos expostos a intoxicação aguda por cádmio (Shemarova *et al.*, 2011) demonstrou que a redução da contratilidade do músculo cardíaco por  $\text{Cd}^{2+}$  é devida não só à sua ação direta de bloqueio em canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , mas também é mediada pelo efeito oxidativo tóxico nas mitocôndrias dos corações dos ratos, manifestada pelo aumento na permeabilidade iônica da membrana mitocondrial interna, distúrbio de transporte de potássio da matriz mitocondrial, e inibição da sua cadeia respiratória.

## 6. Conclusão

A intoxicação por cádmio na dose administrada neste estudo, com ou sem o tratamento com o concentrado suco de uva não promoveu alterações sobre o ganho de massa corporal e sobre a massa cardíaca. Entretanto a intoxicação por cádmio causou alterações na proporção dos subtipos de adrenoceptores  $\beta$  em tecido cardíaco uma vez que houve *down-regulation* de adrenoceptores  $\beta_1$  e *up-regulation* de adrenoceptores  $\beta_2$ . O tratamento com concentrado de suco de uva foi efetivo em atenuar o aumento da expressão do adrenoceptor  $\beta_2$  induzido pelo cádmio mas não modificou seu efeito sobre a expressão dos adrenoceptores  $\beta_1$ . Não é possível esclarecer a partir dos dados obtidos até o momento se estas alterações são adaptativas ou deletérias ao coração.

## 7. Referências Bibliográficas

AGUIAR O. Jr, GOLLÜCKE A.P, MORAES B.B, PASQUINI G, CATHARINO R.R, RICCIO M.F, LHARA S.S, RIBEIRO D.A. Grape juice concentrate prevents oxidative DNA damage in peripheral blood cells of rats subjected to a high-cholesterol diet. **Br. J. Nutr.** 2011. v. 105 (5): 694-702.

AHLQUIST R.P. A study of the adrenotropic receptors. **Am. J. Physiol.** 1948. Jun; v.153 (3): 586-600.

AHSAN H, PARVEEN N, KHAN K.U, HADI S.M. Pro-oxidant, anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Chem Biol Interact.** 1999 Jul; v. 121 (2):161-75

AKINLOYE O, AROWOJOLU A.O, SHITTU O.B, ANETOR J.I. Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. **Reprod. Biol.** 2006 Mar; v. 6 (1): 17-30.

ALBERS A.R, VARGHESE S,VITSEVA O,VITA J.A,FREEDMAN J.E. The anti-inflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. **Arterioscler. Thomb. Vasc. Biol.** 2004. Nov; v. 24 (11): 179-80.

ALISSA E. M, FERNES G. A. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. **J Toxicol.** 2011. Sep; v. 2011: 870125.

ALMIRON-ROIG E, DREWNOWSKI A. Hunger, thirst, and energy intakes following the consumption of caloric beverages. **Physiol. Behav.** 2003 Sep; v. 79 (4-5): 767–73.

AMARA S, GARREL C, FAVIER A, BEN RHOUMA K, SAKLY M, ABDELMELEK H. Effect of static magnetic field and/or cadmium in the antioxidant enzymes activity in rat heart and skeletal muscle. **Gen. Physiol. Biophys.** 2009 Dec; v. 28 (4): 414-9.

ANDRADE TU, PINTO V.D, MEDEIROS A.R, ABREU G.R, MOYSÉS M.R, SAMPAIO K.N, BISSOLI N.S. Effect of enalapril treatment on the sensitivity of cardiopulmonary reflexes in rats with myocardial infarction. **Clin. and Exp. Pharm. and Fisiol.** 2007. Jul; v. 34 (7): 606-11.

ANGELIS R.C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: **Fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas**. São Paulo: Atheneu, 2001. 295p.

ASAGBA S.O. Alteration in the activity of oxidative enzymes in the tissues of male Wistar albino rats exposed to cadmium. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health.** 2010. v. 23 (1): 55-62.



ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) **CERCLA Priority List of Hazzardous Substances**. 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/05list.html/>.

BAILE C.A, YANG J.Y, RAYALAM S, HARTZELL D.L, LAI C.Y, ANDERSEN C, DELLA-FERA M.A. Effect of resveratrol on fat mobilization. **NY Acad. Sci.** 2011. Jan; v.1215: 40-7.

BARLASS M, MILLER R. M, DOUGLAS T. J. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew: II. Resveratrol production. **Am. J. Enol.** 1987. v. 38 (1): 65-68.

BAST A, HAENEN G.R.M.M, DOELMAN C.J.A. "Oxidants and antioxidants: state of the art". **Am. J. Med.** (suppl 3C), 1991. v. 91: 2-13.

BENITEZ D. A, HERMOSO M. A, POZO-GUISADO E, FERNÁNDEZ-SALGUERO P. M, CASTELLÓN E. A. Regulation of cell survival by resveratrol involves inhibition of NF kappa B-regulated gene expression in prostate cancer cells. **Prostate**. Chile. 2009. Jul; v. 1 (69): 1045-54.

BERTELLI A.A, GIOVANNINI L, STRADI R, URIEN S, TILLEMENT, J.P, BERTELLI A. Evaluation of kinetic parameters of natural phytoalexin in resveratrol orally administered in wine to rats. **Drugs under Exp. and Clin. Res.** 1998. v. 24 (1): 51-55.

BJELAKOVIC G. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. **JAMA**. 2007. v. 297 (8): 842–57

BOKORI J, FEKETE S, GLÁVITS R, KÁDÁR I, KONCZ J, KÖVÁRI L. Complex study of the physiological role of cadmium. IV. Effects of prolonged dietary exposure of broiler chickens to cadmium. **Acta Vet.** Hungary. 1996. v. 44 (1): 57-74.

BOSCOLO P; CARMIGNANI M., Mechanisms of cardiovascular regulation in male rabbits chronically exposed to cadmium. **Br. J. Ind. Med.** Italia. 1986. Sep; v. 43 (9): 605-610.

BRISTOW M.R, GINSBURG R, UMANS V, *et al.* b1 and b2 receptors subpopulations in non-failing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective b1-receptor down-regulation in heart failure. **Circ. Res.** 1986. Sep; v. 59 (3): 297-309.

BRISTOW M.R, MINOBE W, RASMUSSEN R, HERSHBERGER R.E, HOFFMANN B.B. Alpha-1 adrenergic receptors in the non-failing heart. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1988. Dec; v. 247 (3):1039-45.

BRISTOW M.R. Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. **J Am. Coll. Cardiol.** 1993. Oct; v. 22 (4 Suppl A): A61-A71.

BRODDE O.E, MICHEL M.C, GORDON E.P, SANDOVAL A, GILBERT E.M, BRISTOW M.R.b-Adrenoreceptor regulation in the human heart: can it be monitored in Circulating lymphocytes. **Eur. Heart J.** 1989. Jun; v. 10 (Suppl B): B2-B10.

BURSTEIN B, MAGUY A, CLÉMENT R, GOSSELIN H, POULIN F, ETHIER N, TARDIF JC, HÉBERT TE, CALDERONE A, NATTEL S.Effects of resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) treatment on cardiac remodeling following myocardial infarction. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 2007. Dec; v. 323 (3):916-23.

BYLUND D.B, EIKENBERG D.C, HIEBLE J.P, LANGER S.Z, LEFKOWITZ R.J, MINNEMAN K.P, MOLINOFF P.B, RUFFOLO R.R, TRENDELENBURG U. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.** USA. 1994. Jun; v. 46 (2): 121-136.

CALABUIG, G. **Medicina Legal y Toxicologia**, E. Villanueva Canadas, Masson; Barcelona; Espanha. 2004. ed. 6ª p. 939-967.

CAMARGO A, RUANO J, FERNANDEZ J.M, PARNELL L.D, JIMENEZ A, SANTOS-GONZALEZ M, MARIN C, PEREZ-MARTINEZ P, UCEDA M, LOPEZ-MIRANDA J, PEREZ-JIMENEZ F. Gene expression changes in mononuclear cells in patients with metabolic syndrome after acute intake of phenol-rich virgin olive oil. **BMC Genomics.** 2010. Apr; v. 20 (11): 253.

CASTAÑEDA-OVANDO A, PACHECO-HERNANDEZ M.L, PAEZ-HERNANDEZ E, RODRIGUEZ J.A, GALAN-VIDAL C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry.** 2009. Apr; v. 113 (4): 859–871.

CATTEAU C, TRENTESAUX T, DELFOSSE C, ROUSSET M.M. Consumption of fruit juices and fruit drinks: impact on the health of children and teenagers, the dentist's point of view. **Arch. Pediatr.** 2012. Feb; v. 19,(2): 118-24. Epub 2011.Dec; 27.

CAZZOLA R, RONDANELLI M, RUSSO-VOLPE S, FERRARI E, CESTARO B. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in over-weight and obese female erythrocytes. **J. Lipid Res.** 2004. Oct; 45 (10): 1846-51.

CESPON-ROMERO, R.M. Application of Factorial Designs for Optimisation of Online Determination of Cadmium, Lead and Nickel in Welding Fumes by Atomic Absorption Spectrometry; **Inter. J. of Envir. Anal. Chem.** 2008. v. 88 (8): 539-547.

CHANG C.J, TZENG T.F, LIOU S.S, CHANG Y.S, LIU I.M. Kaempferol regulates the lipid-profile in high-fat diet-fed rats through an increase in hepatic PPAR $\alpha$  levels. **Planta Med.** 2011. Nov; v. 77 (17): 1876-82.

CHEESEMAN, K.H.; SLATTER, T.F. **Radicais Livres em Medicina**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996.

CHEN Y.T, ZHENG R.L, JIA Z.J, JU Y.. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.** 1990. v. 9(1): 19-21.

CHEN YUE, LU YING, WANG QIANG. The Effect on Cardiac Function in Rabbits by Acute Cadmium Toxicant Exposure. **J. Environ. & Occup. Med.** China. 1999. Feb; v. 2 (10)

CHERNIACK E.P. Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. **Nutrition.** 2011. Jun; v. 27 (6): 617-23.

CHESLEY A, LUNDBERG M. S, ASAI T, XIAO R. P, OHTANI S, LAKATTA E. G, CROW M. T. The beta(2)-adrenergic receptor delivers an antiapoptotic signal to cardiac myocytes through G(i)-dependent coupling to phosphatidylinositol 3'-kinase. **Circ Res.** 2000 Dec; v. 87 (12): 1172-9.

CHO S.J, JUNG U.J, CHOI M.S. Differential effects of low-dose resveratrol on adiposity and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. **Br. J. Nutr.** 2012. Mar; v. 14: 1-10.

CHRISTENSEN M.J, HANCOCK A.L, FORD A.H. Modifying effects of supplemental selenium and sulfur on cadmium toxicity in rats. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 1987. Nov; v. 16 (6): 717-22.

CHOU E.J, KEEVIL J.G, AESCHLIMANN S, WIEBE D.A, FOLTS J.D, STEIN J.H. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. **Am. J. Cardiol.** 2001. Sep; v. 88 (5): 553-5.

CHUNG, S.H.; CHUNG, S.M.; LEE, J.Y.; KIM, S.R.; PARK, K.S.; CHUNG, J.H. The biological significance of non-enzymatic reaction of menadione with plasma thiols: enhancement of menadione-induced cytotoxicity to platelets by the presence of blood plasma. **FEBS Let.** 1999 v. 449: 235-40.

COLIN D; GIMAZANE A; LIZARD G; IZARD J. C; SOLARY E; LATRUFFE N; DELMAS D., Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5 fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. **Int. J. Cancer.** 2009. Jun; v. 124 (12): 2780-2788.

COUCELO J.M, JOAQUIM N, CORREIA V, AZEVEDO J, COUCELO J.A. A histological analysis of the changes experimentally induced by cadmium in cardiac muscle tissue by a computerized method of image analysis. **Rev Port Cardiol.** 1998 Sep;17(9):735-40.

CRAPLET M. French Paradox, 2002; Disponível em: <http://www.euro.care.org/profiles/frenceparadoxeg.htm>.

DANI C, PASQUALI M.A, OLIVEIRA M.R, UMEZU F.M, SALVADOR M, HENRIQUES J.A, MOREIRA J.C. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brains of adult Wistar rats. **J. Med. Food.** 2008. Mar; v. 11(1): 55-61.

DANI C, OLIBONI L.S, UMEZU F.M, PASQUALI M.A, SALVADOR M, MOREIRA J.C, HENRIQUES J.A. Antioxidant and antigenotoxic activities of purple grape juice--organic and conventional--in adult rats. **J. Med. Food.** 2009. Oct; v. 12 (5): 1111-8.

DAS D.K, SATO M, RAY P.S, MAULIK G, ENGELMAN R.M, BERTELLI A.A, BERTELLI A. Cardioprotection of red wine: Role of polyphenolic antioxidants. **Drugs under Exp. and Clin. Res.** 1999. v. 25, (2-3):115-120.

DATTA S. R, DUDEK H, TAO X, MASTERS S, FU H, GOTOH Y, GREENBERG M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell.** 1997 Oct; v.91 (2):231-41.

DATTA S. R, BRUNET A, GREENBERG M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.** 1999 Nov; v. 13 (22): 2905-27.

DÉCORDÉ K, TEISSÈDRE PL, AUGER C, CRISTOL JP, ROUANET JM. Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. **Mol. Nutr. Food Res.** 2008. Apr; v. 52 (4): 400-7.

DI LISA F, KALUDERCIC N, PAOLOCCI N.  $\beta_2$ -Adrenoceptors, NADPH oxidase, ROS and p38 MAPK: another 'radical' road to heart failure? **Br. J. Pharmacol.** 2011. Mar; v. 162 (5): 1009-11.

DOYLE J.J, PFANDER W.H, GREBING S.E, PIERCE J.O. Effect of dietary cadmium on growth, cadmium absorption and cadmium tissue levels in growing lambs. **J. Nutr.** 1974. Feb; v. 104 (2): 160-6.

EASTWOOD M.A. Interaction of dietary antioxidants in vivo: how fruit and vegetables prevent disease? **Q. J. Med.** 1999. Sep; v. 92 (9): 527-30.

EHRlich P. Chemotherapeutics: scientific principles, methods and results. **Lancet.** 1913. v. 2 (13): 445-51.

ENGELHARDT S, HEIN L, WIESMANN F, LOHSE M.J. Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta_1$ -adrenergic receptor transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 1999. Jun; v. 96 (12): 7059–7064.

EVERETT C. J; FRITHSEN I. L., Association of urinary cadmium and myocardial infarction. **Environ. Res.** 2008. Feb; v. 106 (2): 284-6.

FAJARDO G, ZHAO M, BERRY G, WONG L.J, MOCHLY-ROSEN D, BERNSTEIN D.  $\beta_2$ -adrenergic receptors mediate cardioprotection through crosstalk with mitochondrial cell death pathways. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 2011. Nov; v. 51 (5): 781-9.

FERRAMOLA M.L, ANTÓN R.I, ANZULOVICH A.C, GIMÉNEZ M.S. Myocardial oxidative stress following sub-chronic and chronic oral cadmium exposure in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 2011. Jul; v. 32 (1): 17-26.

FLORA S.J, MITTAL M, MEHTA A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. **Indian J Med Res.** 2008 Oct; v. 128 (4): 501-23.

FONSECA, M.R.M. **Química Integral**. São Paulo, FTD, 1993. cap. 7, p.52-53, cap. 8, p. 54-57, cap.34, p.198-200.

FRANKEL E.N, KANNER J, GERMAN J.B, PARKS E, KINSELLA J.E. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. **Lancet.** 1993. Feb; v. 341(8843): 454-7.

FRÉMONT, L. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Sciences.** 2000. Jan; v. 66 (8): 663-673.

FUHRMAN B, LAVY A, AVIRAM M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. **Am. J. Clin. Nutr.** 1995. Mar; v. 61(3): 549 –54.

FUKUHARA K, MIYATA N. Resveratrol as a new type of DNA-cleaving agent. **Bio. Org. Med. Chem. Lett.** 1998. Nov; v. 17 (22): 3187-92.

FUKUHARA K, NAGAKAWA M, NAKANISHI I, OHKUBO K, IMAI K, URANO S, FUKUZUMI S, OZAWA T, IKOTA N, MOCHIZUKI M, MIYATA N, OKUDA H. Structural basis for DNA-cleaving activity of resveratrol in the presence of Cu(II). **Bio. Org. Med. Chem.** 2006. Mar; v. 14 (5): 1437-43.

GANDO S, HATTORI Y, AKAISHI Y, NISHIHARA J, KANNO M. Impaired contractile response to  $\beta$  adrenoceptor stimulation in diabetic rat hearts: alterations in  $\beta$  adrenoceptores - G protein -

adenylatecyclase system and phospholamban phosphorylation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 1997. Jul; v. 282 (1): 475–484.

GEYÜKOĞLU F, TEMELLU A, VURALER O, TURKEZ H. The histochemical and ultrastructural effects of cadmium on mouse EDL Muscle. **Turk. J. Zool.** Turkey. 2005. v. 29 (3): 283-289.

GODT J, SCHEIDIG F, GROSSE-SIESTRUP C, ESCHE V, BRANDENBURG P, REICH A, GRONEBERG DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. **J Occup Med Toxicol.** 2006. Sep; v. 10: 1-22.

GOLLÜCKE A. P. B., Recent applications of grape polyphenols in foods, beverages and supplements. **Rev. Pat. Food Nutr. & Agric.** Santos. Brasil. 2010. Jun; v. 2 (2):105-109.

GOYER, R.A. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (ed) Casarett and Doull's. **Toxicology: the basic science of poisons.** McGraw-Hill, New York, 1996. p. 691-736.

HALL C.E, NASSETH D. Effect of cadmium on salt hypertension in rats. **J Environ. Pathol. Toxicol.** 1979. Jan-Feb; v. 2 (3): 789-97.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. **J. Biochem.** 1985. v. 219 (1): 1-14.

HALLIWELL B. GUTTERIDGE J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** 1999 Oxford University Press, London. 3. ed.

HALLIWELL B. GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 2000. Oxford, New York. 3.ed.

HALLIWELL B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? **Cardiovasc. Res.** 2007. Jan; v. 15 (73): 341-7

HAYEK T, FUHRMAN B, VAYA J. *et al.* Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 1997. Nov; v. 17 (11): 2744 –52.

HOLLIS J.H, HOUCHINS J.A, BLUMBERG J.B, MATTES R.D. Effects of concord grape juice on appetite, diet, body weight, lipid profile, and antioxidant status of adults. **J. Am. Coll. Nutr.** 2009. Oct; v. 28 (5): 574-82.

HOUSTON M.C. The role of mercury and cadmium heavy metals in vascular disease, hypertension, coronary heart disease, and myocardial infarction. **Altern. Ther. Health Med.** 2007. Mar-Apr; v. 13 (2): 128-33.

IBRAHIM D, FROBERG B, WOLF A, RUSYNIAK D.E. Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology. **Clin. Lab. Med.** 2006. Mar; v. 26 (1p): 67-97, viii.

IRITI M, FAORO F. Bioactivity of grape chemicals for human health. **Nat. Prod. Commun.** 2009. May; v. 4 (5): 611-34.

IVERSEN L. L and SALT P. J. Inhibition of catecholamine Uptake<sub>2</sub> by steroids in the isolated rat heart. **Br J Pharmacol.** 1970 November; v. 40(3): 528–530.

JAIN A, MARTIN M.C, PARVEEN N, KHAN N.U, PARISH J.H, HADI S.M. Reactivities of flavonoids with different hydroxyl substituents for the cleavage of DNA in the presence of Cu(II). **Phytother. Res.** 1999. Nov; v. 13 (7): 609-12.

JONES M.M, CHERIAN M.G. The search for chelate antagonists for chronic cadmium intoxication. **Toxicology.** Nashville. USA. 1990. v. 62 (1): 1-25.

JUNG C.H, CHO I, AHN J, JEON T.I, HA T.Y. Quercetin Reduces High-Fat Diet-Induced Fat Accumulation in the Liver by Regulating Lipid Metabolism Genes. **Hytother. Res.** 2012. Mar; DOI: 10.1002/ptr.4687

JUNG KJ, WALLIG MA, SINGLETARY KW. Purple grape juice inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced rat mammary tumorigenesis and in vivo DMBA-DNA adduct formation. **Cancer Lett.** 2006. Feb; v. 233 (2): 279-88.

KAHN CR. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. **J. Cell. Biol.** 1976. Aug; v. 70 (2 pt 1): 261-86.

KAUMANN AJ, LENOINE H. Beta 2-adrenoreceptors mediate positive inotropic effect of adrenaline in human ventricular myocardium. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 1987. Apr; v. 335 (4): 403-11.

KEEVIL J.G, OSMAN H.E, REED J.D, FOLTS J.D. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. **J. Nutr.** 2000. Jan; v. 130 (1): 53-6.

KENNEDY S. G, KANDEL E. S, CROSS T.K, HAY N. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. **Mol Cell Biol.** 1999 Aug; v. 19 (8):5800-10.

KIELY J, HADCOCK J.R, BAHOUTH S.W, MALBON C.C. Glucocorticoids down-regulate beta 1-adrenergic-receptor expression by suppressing transcription of the receptor gene. **J. Biochem.** 1994. Sep; v. 302 (pt2): 397–403.

KLAASSEN, CURTIS D.; CASARETT and DOULL`S **Toxicology**: The Basic Science of Poisons; 5.ed; McGraw-Hill; USA. 1996. p. 91-109; p. 691-696; p. 699-712.

KLAASSEN, CURTIS D.; CASARETT and DOULL`S **Toxicology**: The Basic Science of Poisons; 6.ed; McGraw-Hill; USA. 2001. p. 812-837.

KLEMPNER S.J, BUBLEY G. Complementary and alternative medicines in prostate cancer: from bench to bedside? **Oncologist.** 2012. May; v. 17 (6): 830-7.

KOLAKOWSKI J, BARANSKI B, OPALSKA B. Effect of long-term inhalation exposure to cadmium oxide fumes on cardiac muscle ultrastructure in rats.**Toxicol. Lett.** 1983. Dec; v. 19 (3): 273-8.

LANGLEY J.N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. **J. Physiol.** 1905. Dec; v. 30 (4-5):374-413.

LEE S. E, JU E. M, KIM J. H. Antioxidant activity of extracts from Euryale ferox seed. **Experim. Mol. Med.** 2002 Seoul. South Korea v. 34 (2): 100-106.

LEE M. S, PARK S. K, HU H, LEE S., Cadmium exposure and cardiovascular disease in the 2005 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. **Environ. Res.** 2010; Jan Boston. USA. v. 111 (1): 171-6.

LEI W, WANG L, LIU D, XU T, LUO J. Histopathological and biochemical alternations of the heart induced by acute cadmium exposure in the freshwater crab. Sinopotamon yangtsekiense. **Chemosphere.** 2011. Jul; v. 84(5): 689-94.

LIMBIRD L. E. The receptor concept: a continuing evolution. **Molecular interventions.** 2004. v. 4 (6): 326-336.

LIN X, WU G, HUO W.Q, ZHANG Y, JIN F.S. Resveratrol induces apoptosis associated with mitochondrial dysfunction in bladder carcinoma cells. **Int. J. Urol.** 2012. Aug; v. 19 (8): 757-64

LUDKE A. R, MOSELE F, CARON-LIENERT R, RIBEIRO M. F, PARTATA W, LLESUY S, ARAUJO A. S, SINGAL P, BELLÓ-KLEIN A. Modulation of monocrotaline-induced cor pulmonale by grape juice. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 2010. Jan; v. 55(1): 89-95.



LUNA C, LI G, LITON P. B, QIU J, EPSTEIN D. L, CHALLA P, GONZALEZ P. Resveratrol prevents the expression of glaucoma markers induced by chronic oxidative stress in trabecular meshwork cells. **Food and Chem. Toxicology**. Durham. USA. 2009. Jan; v. 47(1): 198-204.

McNULTY, H. P.; BYUN, J.; LOCKWOOD, S. F.; JACOB, R. F.; MASON, P. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2007. v. 1768(1): 167-174.

MADER I, WABITSCH M, DEBATIN K.M. Identification of a novel proapoptotic function of resveratrol in fat cells: SIRT1-independent sensitization to TRAIL-induced apoptosis. **Faseb J**. 2010. Jun; v. 24(6): 1997–2009.

MAHAN B.H. **Química um curso universitário**. 2 ed. Berkeley-Universidade da California, Ed. Edgard Blucher Ltda. 1972. cap. 16,p. 532-533.

MAILLOUX R, LEMIRE J, APPANNA V. Aluminum-induced mitochondrial dysfunction leads to lipid accumulation in human hepatocytes: A link to obesity. **Cell. Physiol. Biochem**. 2007. Apr; v. 20 (5): 627–638.

MANACH C, WILLIAMSON G, MORAND C, SCALBERT A, RÈMÉSY C. Bioavailability and bio efficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr**. 2005. Jan; v. 81(1): 230–242.

MANCA D, RICARD AC, TROTTIER B, CHEVALIER G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. **Toxicology**. 1991 May; 67 (3): 303-23.

MANNA P, SINHA M, SIL P. C. Amelioration of cadmium-induced cardiac impairment by taurine. **Chem. Biol. Interact**. India. 2008. Jul; v. 174 (2): 88-97.

MAYDATA A. G. Vino, polifenoles y protección a la salud. **Rev. Cubana Aliment. Nutr**. Havana. Cuba. 2002. v. 16 (2): 134-141.

MELANSON K. J, ZUKLEY L, LOWNDES J, NGUYEN V, ANGELOPOULOS T. J, RIPPE J. M. Effects of high-fructose corn syrup and sucrose consumption on circulating glucose, insulin, leptin, and ghrelin and on appetite in normal-weight women. **Nutrition**. USA. 2007. Feb; v. 23 (2): 103-12.

MILANO C. A, ALLEN L. F, ROCKMAN H. A, DOLBER P. C, MCMINN T. R, CHIEN K. R, JOHNSON T. D, BOND R. A, LEFKOWITZ R. J. Enhanced myocardial receptor function in transgenic mice overexpressing the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. **Science**. 1994. Apr; v. 264 (5158): 582–586.

MITRA E, GHOSH A. K, GHOSH D, MUKHERJEE D, CHATTOPADHYAY A, DUTTA S, PATTARI S. K, BANDYOPADHYAY D. Protective effect of aqueous Curry leaf (*Murraya koenigii*) extract against cadmium-induced oxidative stress in rat heart. **Food Chem. Toxicol.** 2012. May; v. 50 (5): 1340-53.

MOLNÁR-PERL I, FÜZFAI Z. Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **J. Chromatogr. A.** 2005. May; v.1073 (1-2): 201-27.

MORAN J. F, KLUCAS R. V, GRAYER R. J, ABIAN J, BECANA M. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: prooxidant and antioxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.** 1997. v. 22 (5): 861-70.

MOURA R. C. **Investigação do remodelamento cardíaco mediado por receptores beta adrenérgicos em tecido cardíaco de ratos.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, Santos, 2012.

MUQBIL I, BECK F. W, BAO B, SARKAR F. H, MOHAMMAD R. M, HADI S. M, AZMI A. S. Old wine in a new bottle: the Warburg effect and anticancer mechanisms of resveratrol. **Curr. Pharm. Des.** 2012. v. 18 (12): 1645-54.

MUNTAU H; BAUDO R., Sources of cadmium, its distribution and turnover in the freshwater environment. **IARC Sci. Publ. Italy.** 1992. v. 118:133-148.

O'BYRNE D. J, DEVARAJ S, GRUNDY S. M, JIALAL I. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids alpha-tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults. **Am. J. Clin. Nutr.** 2002. Dec; v. 76 (6): 1367–74.

ORISAKWE O. E; ASOMUGHA R; AFFONE O. J; ANISI C. N; OBI E; DIOKA C. E. Impact of effluents from a car battery manufacturing plant in Nigeria on water, soil, and foods quality. **Arch. Envir. Health.** Nigéria. 2004. Jan; v. 59(1): 31-36.

OZTURK I. M, BUYUKAKILLI B, BALLI E, CIMEN B, GUNES S, ERDOGAN S. Determination of acute and chronic effects of cadmium on the cardiovascular system of rats. **Toxicol. Mech. Methods.** Turkey. 2009. May; v. 19 (4): 308-17.

PADILLA M. A, ELOBEID M, RUDEN M. D, ALLISON D. B. An Examination of the Association of Selected Toxic Metals with Total and Central Obesity Indices: NHANES 99-02. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** USA. 2010. Sep; v. 7 (9): 3332–3347.

PANDE, M.; MEHTA, A.; PANT, B.P.; FLORA, S.J.S. Combined administration of a chelating agent and an antioxidant in the prevention and treatment of acute lead intoxication in rats. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 2001. v. 9: 173-184.

PEREIRA M. D, HERDEIRO R. S, FERNANDES P. N, ELEUTHERIO E. C .A. PANEK A. D. Targets of oxidative stress in yeast sod mutants. **Bioch. Bioph. Acta.** 2003. v. 1620: 245-251.

PERSAD S, TAKEDA S, PANAGIA V, DHALLA N. S. Beta-adrenoceptor-linked signal transduction in ischemic-reperfused heart and scavenging of oxyradicals. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 1997.Feb;v.29(2):545-58.

PEZZUTO J. M. Grapes and human health: a perspective. **J. Agric. Food Chem.** 2008 Aug; v. 27(56): 6777-84. Epub 2008. Jul 29.

PIRES C. V. **Efeitos do concentrado de suco de uva em parâmetros reprodutivos de ratos expostos ao cloreto de cádmio.** 2012. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, Santos.

PONTIROLI A. E, MIELE L, MORABITO A. Increase of body weight during the first year of intensive insulin treatment in type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. **Diabetes Obes. Metab.** 2011. Nov; v.13 (11): 1008-19.

PREDES F. S, DIAMANTE M. A, DOLDER H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. **Int. J. Exp. Pathol.** 2010. Apr; v. 91(2): 125-31.

PROKOP J, ABRMAN P, SELIGSON A. L, SOVAK M. Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. **J. Med. Food.** 2006. v. 9 (1): 11–4.

RAYALAM S, YANG J. S, AMBATI S. Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **Phytotherapy Res.** 2008. Oct; v. 22 (10): 1367–1371.

RAYALAM S, DELLA-FERA M. A, BAILE C. A. Synergism between resveratrol and other phytochemicals: implications for obesity and osteoporosis. **Mol. Nutr. Food Res.** 2011. Aug; v. 55 (8): 1177-85.

REEVES, PHILIP G, CHANEY, RUFUS L. Bioavailability as an Issue in Risk Assessment and Management of Food Cadmium: A review; **Sci. Total Environment.** 2008. Jul; v. 398 (1-3): 13-9.

ROBARDS K and WORSFOLD P. Cadmium: Toxicology and Analysis. **Analyst.** 1991. v. 116 (6): 549-68.

RODIN J. Comparative effects of fructose, aspartame, glucose, and water preloads on calorie and macronutrient intake. **Am. J. Clin. Nutr.** 1990. Mar; v. 51(3): 428-35.

RODIN J. Effects of pure sugar vs. mixed starch fructose loads on food intake. **Appetite**.1991. Dec; v. 17(3): 213-9.

RODRIGO R, MIRANDA A, VERGARA L. Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. **Clin. Chim. Acta**. 2011. Feb; v. 412 (5-6): 410-24.

ROLLS B. J, BARNETT R. A. A systematic lifetime approach to eating. **Volumetrics**. New York, NY: Harper Collins, 2000.

ROMASHKOVA J. A, MAKAROV S. S. NF-kappa B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. **Nature**. 1999 Sep; v.401 (6748): 86-90.

RONCO A. M, URRUTIA M, MONTENEGRO M, LLANOS M. N. Cadmium exposure during pregnancy reduces birth weight and increases maternal and foetal glucocorticoids. **Toxicol. Lett**. 2009. Aug; v.188 (3): 186-91.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. **Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo**. Química Nova. São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUBIO C, HARDISSON A, REGUERA J, REVERT C, LAFUENTE M. A, GONZALEZ-IGLESIAS T. Cadmium Dietary Intake in the Canary Islands, Spain. **Environ. Res**. 2006. Jan; v. 100 (1): 123-129.

SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidant: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **J. Am. Coll. Nut.** 2001. 20 (5): 464-472.

SANTOS F. W, ORO T, ZENI G, ROCHA J. B. T, NASCIMENTO P. C, NOGUEIRA, C. W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicol. Lett**. 2004, v. 152: 255–263.

SANTOS I. N, SPADARI-BRATFISCH R. C. Stress and cardiac beta adrenoceptors. **Stress**. Campinas. Brasil. 2006. Jun; v. 9 (2): 69-84.

SATARUG S; MOORE M. R. Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. **Environ. Health Perspect**. 2004. Jul; v. 112 (10): 1099–1103.

SATARUG S, NISHIJO M, LASKER J. M, EDWARDS R. J; MOORE M. R. Kidney dysfunction and hypertension: role for cadmium, p450 and hemeoxygenases? **Tohoku J. Exp. Med.** 2006. Mar; v. 208 (3): 179-202.

SAUCIER C, MIRABEL M, DAVIAUD F, LONGIERAS A, GLORIES Y. Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. **J. Agric. Food Chem.** 2001. Dec; v. 49 (12): 5732-5.

SCALBERT A, WILLIAMSON G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Am. Soc. Nutr. Sci.** 2000. Aug; v. 130 (8 suppl): 2073–2085.

SHAFFER T. J. Effects of Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> and CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> on high voltage-activated calcium currents in pheochromocytoma (PC12) cells: potency, reversibility, interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> and mechanisms of block. **Toxicol Lett.** 1998. Nov 12; 99 (3): 207-21.

SCHROEDER H. A, VINTON W. H. Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. **Am. J. Physiol.** 1962. Mar; v. 202: 515–518.

SCHULZE M. B, MANSON J. E, LUDWIG D. S, *et al.* Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. **JAMA.** 2004. Aug; v. 292 (8): 927–34.

SEDDON M, LOOI Y. H, SHAH A. M. Oxidative stress and redox signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart.** 2007. 93 (8): 903-7.

SHEMAROVA I. V, KOROTKOV S. M, NESTEROV V. P. Influence of oxidative processes in mitochondria on contractility of the frog *Rana temporaria* heart muscle. Effects of cadmium. **Zh Evol Biokhim Fiziol.** 2011 Jul-Aug; 47 (4): 306-10.

SHERLOCK J. C. Cadmium in foods and the diet. **Experientia.** 1984. Feb; v. 40 (2):152-6.

SHITE J, QIN F, MAO W, KAWAI H, STEVENS S. Y, LIANG C. Antioxidant vitamins attenuate oxidative stress and cardiac dysfunction in tachycardia-induced cardiomyopathy. **J. Am. Coll. Cardiol.** 2001. Nov; v. 15 (38): 1734-40

SOENEN S, WESTERTERP-PLANTENGA M. S. No differences in satiety or energy intake after high-fructose corn syrup, sucrose, or milk preloads. **Am. J. Clin. Nutr.** 2007. Dec; v. 86 (6): 1586-94.

SOYOUNG K, YOOJEONG J, YOUNGSHIM C, TAESUN P. Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. **Biochem. Pharmacol.** South Korea. 2011. Jun; v. 81 (11): 1343-51.

SOUZA, M. C. de. **Qualidade e atividade antioxidante de frutos de diferentes progênies de açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart).** 2007. 124f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SPITZER L, RODIN J. Effects of fructose and glucose preloads on subsequent food intake. **Appetite**. 1987. Apr; v. 8 (2): 135-45.

STEIN U. & HOOS G. Methods for induction and determination of stilbenes in Vitaceae. **Vitis**. 1984. v. 23 (3): 179-194.

STEIN J. H, KEEVIL M. D, WIEBE D. A. Purple Grape Juice Improves Endothelial Function and Reduces the Suscetibility of LDL Cholesterol to Oxidation in Patient With Coronary Artery Disease. **Circulation**. 1999. Sep; v. 100(10): 1050-1055

STILES G. L, TAYLORS S, LEFKOWITZ R. J. Human cardiac b-adrenergic receptors:subtype heterogeneity delineated by direct radioligand binding. **Life Sci**. 1983. Aug; v. 33 (5): 467-73.

SUPORNILCHAI V, SVECHNIKOV K, SEIDLOVA-WUTTKE D, WUTTKE W, SÖDER O. Phytoestrogen resveratrol suppresses steroidogenesis by rat adrenocortical cells by inhibiting cytochrome P450 c21-hydroxylase. **Horm Res**. 2005. v. 64(6): 280-6. Epub 2005 Nov 1.

TORDOFF M. G, ALLEVA A. M. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. **Am. J. Clin. Nutr**. 1990. Jun; v. 51(6): 963–69.

TSUDA T, HORIO F, UCHIDA K, AOKI H, OSAWA T. Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. **J. Nutr**. 2003. Jul; v. 133 (7): 2125–30.

VALKO M, MORRIS H, CRONIN M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr. Med. Chem**. 2005. v. 12 (10): 1161-208.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN M. T, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Chem Biol Interact**. 2007. v. 160 (1): 1-40.

VANHEES L, ALBERT A, FAGARD R. Influence of  $\beta_1$  versus  $\beta_2$  adrenoreceptor blockade on left ventricular function in humans. **J. Cardiovasc. Pharmacol**. 1986. Sep-Oct; v. 8 (5): 1086-91.

WALLERATH T, DECKERT G, TERNES T, ANDERSON H, LI H, WITTE K, FÖRSTERMANN U. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. **Circulation**. 2002. Sep; v. 106 (13): 1652-8.

WILLIAMS R. J, SPENCER J. P. E, RICE-EVANS C. Flavonoids: Antioxidants Or Signalling Molecules? **Free Radic. Biol. Med.** 2004. Apr; v. 36 (7): 838 – 849.

WHO. Recommended health-based limits in occupational exposure to heavy metals. Report of a study group, Geneva, **WHO**. 1980 (Technical Report Series No. 647).

WHO. Guidelines for drinking-water quality: Health criteria and other supporting information, Geneva, **WHO**. 1984 v. 2: 84-90.

WHO. Air quality guidelines for Europe, Copenhagen, **WHO**. 1987 Regional Office for Europe. v. 23: 200-209.

WHO. Cadmium. In: Evaluation of certain food additives and contaminants. Thirty-third Report of the Joint **FAO/WHO**. 1989 p. 28-31 (Technical Report Series No. 776).

WHO. Cadmium (Environmental Health Criteria No. 134). Geneva: **WHO**. 1992.

XIAO R. P. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta- adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. **Science STKE** . 2001. Oct; (104): 15-9

XU D. X, SHEN H. M, ZHU Q. X, CHUA L, WANG Q. N, CHIA S. E, ONG C. N. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and

concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. **Mutat. Res.** 2003. Jan; v. 534 (1-2): 155-63.

YAZIHAN N, KOCAK M. K, AKCIL E, ERDEM O, SAYAL A. Role of midkine in cadmium-induced liver, heart and kidney damage. Ankara, Turkey. **Hum. Exp. Toxicol.** 2010. May; v. 30(5): 391-7.

YAZIHAN N, KOÇAK MK, AKÇIL E, ERDEM O, SAYAL A, GUVEN C, AKYUREK N. Involvement of galectin-3 in cadmium-induced cardiac toxicity. **Anadolu Kardiyol Derg.** 2011. Sep; v. 11 (6): 479-84.

YOO B, LEMAIRE A, MANGMOOL S *et al.*  $\beta$ 1-adrenergic receptor stimulate cardiac contractility and CaMKII activation in vivo and enhance cardiac dysfunction following myocardial infarction. **Am. J. Physiol.** 2009. Oct; v. 297 (4): 1377-86.

YU B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol. Rev.** 1994. Jan; v. 74 (1): 139-62.

ZASLAVINA S. V, SKLIANOV I. U. I, BGATOVA N. P. Structural changes of rat myocardium in the mother-fetus system exposed to cadmium. **Morfologia.** Russia. 2007. v. 132 (6): 42-5.

ZIKIĆ R. V, STAJN A. S, OGNJANOVIĆ B. I, SAICIĆ Z. S, KOSTIĆ M. M, PAVLOVIĆ S. Z, PETROVIĆ V. M. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. **J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.** 1998. v. 17 (3-4): 259-64.

ZHU W. Z, ZHENG M, KOCH W. J, LEFKOWITZ R. J, KOBILKA B. K, XIAO R. P. Dual modulation of cell survival and cell death by beta 2-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2001. Feb; v. 98(4): 1607–1612.

ZHU W, ZENG X, ZHENG M, XIAO R. P. The enigma of beta2-adrenergic receptor Gi signaling in the heart: the good, the bad, and the ugly. **Circ. Res.** 2005. Sep; v.16;97(6): 507-9.



## 8. Anexos



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de fevereiro de 2012  
CEP Nº: 0027/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Daniel Malingre Vieira

Disciplina/Departamento Farmacologia- CAMPUS BAIXADA SANTISTA

Pesquisadores associados: Isabel Cristina Cespedes, Lila Missae Oyama, Regina Celia Spadari (orientadora)

### Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

**TÍTULO DO ESTUDO:** Expressão de Adrenocetores em Tecido Cardíaco de Ratos Intoxicados por Cádmio e Tratados com Suco de Uva

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Experimental, categoria C - estudo crônico

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica

**OBJETIVO DO ESTUDO:** Os objetivos do presente estudo consistem em caracterizar as alterações na expressão dos adrenocetores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  em tecido cardíaco de ratos submetidos à intoxicação crônica (56 dias) por cádmio, bem como analisar o efeito do concentrado de suco de uva rico em resveratrol na reversão ou atenuação das alterações causadas pelo metal.

**RESUMO:** Estudo com 20 ratos wistar, machos, com 3 meses. Eutanásia: decapitação. Serão constituídos os seguintes grupos: a. Controle: animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de solução salina 0,9% e gavagem diária com água por 56 dias. b. Cádmio: animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de 1,2 mg/Kg peso corporal de cloreto de cádmio e gavagem diária com água por 56 dias. c. Cádmio + CSU (2,36 g/Kg/dia): animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de 1,2 mg/Kg peso corporal de cloreto de cádmio e gavagem diária de 2,36 g/Kg/dia de concentrado de suco de uva por 56 dias. d. CSU (2,36 g/Kg/dia): animais submetidos a uma única injeção intraperitoneal de 1,2 mg/Kg peso corporal de solução salina e gavagem diária de 2,36 g/Kg/dia de concentrado de suco de uva por 56 dias. O concentrado de suco de uva utilizado será o G8000 fornecido pela empresa Golden Sucos® (Farroupilha-RS, Brasil). A matéria-prima utilizada na elaboração do concentrado são uvas das variedades Bordô e Concord. As dosagens de G8000 a serem testadas no presente estudo foram calculadas a partir das considerações da American Dietetic Association., (2004), a qual atesta que o consumo de 250-500 mL/ dia de suco de uva ou vinho previne agregação plaquetária e de outros trabalhos que mostram efeitos fisiológicos dos polifenólicos em humanos com o consumo diário de 500-1000 mL de vinho ou suco de uva. Serão realizadas as seguintes análises: Determinação do Peso Absoluto e Relativo do Coração; Western Blot para detectar a intensidade de expressão protéica dos adrenocetores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  no tecido cardíaco.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** O cádmio é um metal pesado tóxico amplamente encontrado em lugares expostos a contaminação por poluentes industriais e locais de operação de resíduos, tende a poluir o solo agrícola e o mar afetando a dieta humana e tornando as fontes primárias principais de exposição ao homem entre os não fumantes. Numerosos estudos associam os níveis de exposição ao cádmio a potenciais efeitos adversos à saúde humana, afetando principalmente órgãos alvo como rins, fígado e ossos. Evidências de estudos prospectivos revelam potenciais relações causais de exposição ao cádmio, com prognóstico de vida (mortalidade por qualquer causa) e mortalidade por câncer em excesso e sugerem que o cádmio é pelo menos um fator de susceptibilidade, se não um fator causal. Entretanto carecem estudos que investiguem seus plausíveis efeitos sobre a doença cardiovascular e ainda sobre a plasticidade do tecido cardíaco na presença deste contaminante. Alguns estudos sugerem que entre seus possíveis efeitos cardiovasculares adversos há promoção da aterosclerose que induz desvantajosas alterações cardíacas funcionais e metabólicas geradas por uma certa elevação de atividade catecolaminica e, principalmente através de sua capacidade em gerar espécies reativas de oxigênio além da intrínseca capacidade tecidual de neutraliza-los. Tais eventos no coração suscitam aumento da atividade dos adrenocetores  $\beta_1$  que reconhecidamente elevam a atividade apoptótica e necrótica cardíaca. Nestas circunstâncias todavia, há evidências de ativação simultânea do adrenocetor  $\beta_2$  que está envolvido com cardio-proteção frente a eventos isquêmicos e também resultantes do aumento do estresse oxidativo tal como os que são gerados na intoxicação pelo cádmio. Particularmente a intoxicação pelo cádmio é de difícil tratamento e tem se tentado utilizar substâncias com capacidade antioxidante que constituam uma alternativa terapêutica ao uso de agentes quelantes. Nesta classe, um dos agentes mais promissores é o resveratrol, presente em uvas e bebidas derivadas, que possui reconhecida atividade anti-aterosclerótica e cardioprotetora que pode representar um viés adequado em lidar com este desafio terapêutico.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo

**TCLE:** Não se aplica

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** CAPES - R\$ 2200,00

**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 24 meses

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA:** 11/02/2013 e 06/02/2014

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo